



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 14/435, 16/18, C12P 21/08, C12N 5/20, 15/63, 5/10, A61K 48/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/11786</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月11日(11.03.99)</p>		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="131 363 803 1058"> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03841</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月28日(28.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/252770 1997年9月1日(01.09.97) JP 特願平10/44312 1998年2月10日(10.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 尾崎浩一(OZAKI, Kouichi)(JP/JP) 〒770-0865 徳島県徳島市南末広町2-67 リバーサイド南末広7番館606号 Tokushima, (JP) 永田真粧美(NAGATA, Masami)(JP/JP) 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 今切寮 Tokushima, (JP) 藤原 力(FUJIWARA, Tsutomu)(JP/JP) 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字中島161-8 Tokushima, (JP)</p> </td> <td data-bbox="803 363 1466 1058"> <p>平野尚伸(HIRANO, Hisanobu)(JP/JP) 〒771-0212 徳島県板野郡松茂町中喜来字福有開拓77-18 Tokushima, (JP) 急式弘之(KYUSHIKI, Hiroyuki)(JP/JP) 〒771-0203 徳島県板野郡北島町中村字宮北裏27-503 Tokushima, (JP) 岡本考史(OKAMOTO, Takashi)(JP/JP) 〒771-0125 徳島県徳島市川内町金岡5-2-302 Tokushima, (JP) 新美正史(NIIMI, Masashi)(JP/JP) 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野513-7-203 Tokushima, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03841</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月28日(28.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/252770 1997年9月1日(01.09.97) JP 特願平10/44312 1998年2月10日(10.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 尾崎浩一(OZAKI, Kouichi)(JP/JP) 〒770-0865 徳島県徳島市南末広町2-67 リバーサイド南末広7番館606号 Tokushima, (JP) 永田真粧美(NAGATA, Masami)(JP/JP) 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 今切寮 Tokushima, (JP) 藤原 力(FUJIWARA, Tsutomu)(JP/JP) 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字中島161-8 Tokushima, (JP)</p>	<p>平野尚伸(HIRANO, Hisanobu)(JP/JP) 〒771-0212 徳島県板野郡松茂町中喜来字福有開拓77-18 Tokushima, (JP) 急式弘之(KYUSHIKI, Hiroyuki)(JP/JP) 〒771-0203 徳島県板野郡北島町中村字宮北裏27-503 Tokushima, (JP) 岡本考史(OKAMOTO, Takashi)(JP/JP) 〒771-0125 徳島県徳島市川内町金岡5-2-302 Tokushima, (JP) 新美正史(NIIMI, Masashi)(JP/JP) 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野513-7-203 Tokushima, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03841</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月28日(28.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/252770 1997年9月1日(01.09.97) JP 特願平10/44312 1998年2月10日(10.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 尾崎浩一(OZAKI, Kouichi)(JP/JP) 〒770-0865 徳島県徳島市南末広町2-67 リバーサイド南末広7番館606号 Tokushima, (JP) 永田真粧美(NAGATA, Masami)(JP/JP) 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 今切寮 Tokushima, (JP) 藤原 力(FUJIWARA, Tsutomu)(JP/JP) 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字中島161-8 Tokushima, (JP)</p>	<p>平野尚伸(HIRANO, Hisanobu)(JP/JP) 〒771-0212 徳島県板野郡松茂町中喜来字福有開拓77-18 Tokushima, (JP) 急式弘之(KYUSHIKI, Hiroyuki)(JP/JP) 〒771-0203 徳島県板野郡北島町中村字宮北裏27-503 Tokushima, (JP) 岡本考史(OKAMOTO, Takashi)(JP/JP) 〒771-0125 徳島県徳島市川内町金岡5-2-302 Tokushima, (JP) 新美正史(NIIMI, Masashi)(JP/JP) 〒771-0130 徳島県徳島市川内町加賀須野513-7-203 Tokushima, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>			
<p>(54)Title: pancpin GENE AND COMPOSITION FOR GENE THERAPY</p> <p>(54)発明の名称 pancpin遺伝子及び遺伝子治療用組成物</p> <p>(57) Abstract A gene containing a base sequence encoding the whole amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or a part of the same; a protein obtained via the expression thereof; a specific antibody against this protein; a vector for gene transfer containing the above gene; cells carrying this vector; a composition for gene therapy containing the same as the active ingredient; and a gene therapy method. The protein obtained by expressing the above gene has the effect of inhibiting the formation, advance and metastasis of tumor in the pancreas. Therefore, it is useful in, for example, clarifying, diagnosing, preventing and treating cancers such as pancreatic cancer and malignant transformation thereof. The above gene therapy method is efficacious in suppressing the proliferation of cancers such as pancreatic cancer and in inhibiting metastasis of the same.</p>				

本発明は、配列番号：1で示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含む遺伝子、その発現蛋白質及び該蛋白質に対する特異抗体、並びに上記遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター、これを保有する細胞、これらを有効成分とする遺伝子治療用組成物及び遺伝子治療法を提供するものである。

本発明遺伝子を発現させて得られる蛋白質は、脾臓の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有しており、脾臓癌などの癌や癌化の解明、その診断、予防及び治療などに有用である。また本発明遺伝子治療法は、特に、脾臓癌などの癌の増殖抑制並びに転移抑制処置に有効である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン						

明 細 書

pancpin遺伝子及び遺伝子治療用組成物

技 術 分 野

- 本発明は、膵臓癌細胞の成長、分裂、転移に関連する
- 5 膵臓特異的癌関連遺伝子、より詳しくは、セリン・プロ
テアーゼ・インヒビターであるセルピンに相同性を有す
る新規な膵臓特異的癌関連遺伝子（以下、この遺伝子を
「pancpin遺伝子」という）、該遺伝子によってコードさ
れる新規な蛋白質及びその特異抗体に関する。
- 10 また、本発明は、pancpin遺伝子の全部又は一部を含有
する、遺伝子治療のための遺伝子導入用ベクター、該ベ
クターによってpancpin遺伝子が導入された細胞、該ベク
ター又は細胞を有効成分とする、ヒトの癌、特に膵臓癌
の遺伝子治療のための遺伝子治療用組成物（癌治療剤乃
15 至癌転移抑制剤）、該遺伝子治療用組成物を用いる遺伝
子治療法、及び該遺伝子治療用組成物の製造のための
pancpin遺伝子の使用に関する。

背 景 技 術

- 膵臓癌は、日本及び西側諸国において癌関連死亡順位
- 20 の4位及び5位を占めるように、消化器系の悪性腫瘍の
中でも最も予後不良な癌のひとつである（Poston, J. G.,
et al., Gut., 32, 800-812 (1991)）。

癌研究における最も重要なゴールは、癌化に至る早期の遺伝子の変化を見分けることである。この遺伝子の変化の見極めは、致死的な疾患である癌の早期診断のための遺伝子的ツールの開発と、この癌をより効果的に治療するための新規な治療的アプローチとを導くことができる。

セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、細胞の凝集、線維化、成長、悪性腫瘍化及び炎症を含む幅広い多様な生理学的過程の調節における中心的な役割を演じていることが知られている(Potempa, J., et al., J. Biol. Chem., 269, 15957-15960 (1994))。

該セリン・プロテアーゼ・インヒビターの属するセルピン・ファミリーの1つの分派(スーパーファミリー)は、5種の蛋白質(オボアルブミン、マスピン、鱗状細胞癌抗原、プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター-2 (PAI-2)及び単球/好中球エラスターゼ・インヒビター)により構成されている(Remold-O'Donnel, E., FEBS Lett., 315, 105-108 (1993))。

これらの蛋白質(インヒビター)の生理学的役割は未だあまり解明されてはいないが、それらの産生や放出における変化は、癌化と炎症に関連することが知られている。例えば、マスピンの喪失は、乳癌の発生と転移能の

上昇(Zou Z., et al., Science, 263, 526-529 (1994))、
扁平上皮癌に生じる鱗状細胞癌抗原の発現と放出の上昇
(Schneider S. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci.,
USA, 92, 3147-3151 (1995))、及び炎症の発症と単球の
5 P A I - 2 の発現の上昇(Ganesh S. S. C. F. M., et
al., Cancer Res., 54, 4065-4071 (1994))に相関してい
る。

かかるインヒビターの生理的役割の解明とそれにより
得られる情報は、癌化や炎症の機能の解明に役立つ。従
10 って、かかる情報の入手が、基礎科学研究の分野はもと
より、医薬品分野においても、癌や炎症などの発症機構
の解明やそれらの予防及び処置法の開発面から、望まれ
るところである。

一方、近年、遺伝子工学の進歩により、多くの遺伝病
15 の原因遺伝子が同定・単離され、病態の分子機構の解明
がなされてきている。上記原因となる遺伝子の異常が
D N A レベルで研究できるようになった結果、該遺伝子
を正常に戻し得る遺伝子治療の可能性が報告され、例え
ば、p 5 3 遺伝子を代表とする癌抑制遺伝子を生体細胞
20 内に導入して、異常な癌抑制遺伝子を補修、修復し、か
くして、癌の進展を抑制する試みが既に行われている。

また従来より、癌や白血病に対する他の遺伝子治療法

としては、レトロウイルスベクターを利用して腫瘍浸潤リンパ球に腫瘍壊死因子（TNF）やインターフェロン（IFN）を導入する方法、サイトカイン遺伝子の導入による免疫系を介した免疫賦活療法、薬剤耐性遺伝子（MDR）を導入する方法、自殺遺伝子（HSV-TK 遺伝子投与後にガンシクロビルやシトシンジアミナーゼを投与すると細胞が死ぬ）を導入する方法、癌遺伝子、癌増強因子乃至そのレセプター遺伝子などの発現を、それらに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドやリボザイムで抑制する方法などが試みられている。

現在、米国を中心に100以上のプロトコールで数百人が上記の如き遺伝子治療を受けている。これらの疾患には、代表疾患であるADA欠損症を始め、家族性高コレステロール血症、嚢胞性繊維症(cystic fibrosis)、血友病などの遺伝病、メラノーマ、悪性脳腫瘍、白血病、神経芽細胞腫、腎癌などが包含される。遺伝子治療法は、これらの各種疾患患者の免疫増強法としてや、薬剤耐性遺伝子及びアンチセンス遺伝子の導入による癌治療法として有用である。

これらの疾患に対する遺伝子治療法のプロトコールは、米国NIHやFDAの組換えDNAアドバイザー委員会で作製され、臨床実施に当り承認を得た後、それらの

各疾患に対する遺伝子治療法として実施されている

[Roth, J. A., Hum. Gene Ther., 4, 365-389 (1993);
Roth, J. A., Hum. Gene Ther., 7, 861-874 (1996)]。

また本邦においても、1993年4月に遺伝子治療のガイド
5 ラインが発表され〔高久史麿, Mol. Med., 30, 1580-
1583 (1993)〕、1995年8月にA D A 欠損症に対する遺伝
子治療が初めて開始された。

しかしながら、いずれの疾患に対するいずれの遺伝子
治療法でも、現在のところ確実な成功への成果は得られ
10 ておらず、これらの方法は補助療法的な範疇の域をでない
現状にある。

上記遺伝子治療によってより有効な成果をあげるため
には、標的細胞への遺伝子導入効率を上げるベクターの
開発や、リポソームによる遺伝子導入法などの様々な遺
15 伝子導入法の開発・改良などが必要である。

上記導入効率の良いベクターの開発や遺伝子導入方法
の改良に加えて、当業界では、遺伝子治療のための新た
な癌特異的遺伝子や、癌の増殖・抑制に強く関連する新
しい遺伝子などの同定・単離も所望されている。

20 本発明の目的は、斯界で要望されるセルピンファミリ
ーに属する各種インヒビターの役割解明に役立つ情報を
提供すること、殊にセリン・プロテアーゼ・インヒビタ

一であるセルピンに相同性を有する新規な蛋白相同物、並びにこれをコードする遺伝子及び上記蛋白質を特異的に認識する抗体を提供することにある。

5 本発明の他の目的は、遺伝子治療技術、殊に癌の遺伝子治療に有効な遺伝子導入用ベクター、該ベクターを保有する細胞、かかるベクター及び細胞を利用する遺伝子治療法、特に腫瘍形成、腫瘍進展及び癌転移を抑制できる新しい遺伝子治療用組成物及びその利用による癌治療法及び癌転移抑制法を提供することにある。

10 本発明者は、各種ヒト組織由来の遺伝子につき検索を重ねた結果、上記目的に合致する新しい膵臓特異的癌関連遺伝子の単離、同定に成功した。

また本発明者は、上記膵臓特異的癌関連遺伝子を含む、上記目的に合致する遺伝子治療のための遺伝子導入用ベ
15 クター及びこれを保有させた細胞の開発に成功した。

本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

発 明 の 開 示

本発明によれば、まず第1に、以下の(a)及び(b)
20 のいずれかの蛋白質をコードする塩基配列を含む pancpin遺伝子、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、腫瘍の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有する蛋白質。

第2に、本発明によれば、配列番号：3で示される塩基配列を有する上記pancpin遺伝子、該遺伝子によってコードされるpancpin蛋白質及び該蛋白質を特異的に認識する抗体が提供される。

第3に、本発明によれば、以下の(a)及び(b)のいずれかのポリヌクレオチドからなるpancpin遺伝子、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

(a) 配列番号：2で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

第4に、本発明によれば、遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用される上記遺伝子のDNA断片が提供される。

第5に、本発明によれば、配列番号：3で示される塩

基配列の全部又は一部を含むpancpin遺伝子を含有する遺伝子治療のための遺伝子導入用ベクター及び該ベクターを保有する細胞が提供される。

特に、本発明において、上記ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、H I V (human immunodeficiency virus)ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター及びエプスタインバーウイルスベクターから選択されるものであるのが好ましい。

10 また、上記細胞は、これらのベクターを保有するもの、特にこれらのベクターを、リン酸カルシウム共沈法、リポソームと不活性化センダイウイルスを融合させて膜融合リポソームに包埋させる膜融合リポソーム法、プラスミドDNAを金でコートして高圧放電によって物理的に
15 細胞内にDNAを導入する方法、プラスミドDNAを直接インビボで臓器、腫瘍中に注入するネイキッドDNA法、多重膜正電荷リポソームに包埋した遺伝子を細胞に導入するカチオニックリポソーム法、及び目的とする細胞に発現するレセプターに結合するリガンドをDNAと
20 結合させるリガンド-DNA複合体法から選ばれる遺伝子導入法によって導入させてなるものであるのが好ましい。

第 6 に、本発明によれば、上記ベクター及び細胞を有効成分とする遺伝子治療組成物及びこれらを利用する遺伝子治療法が提供される。

特に、本発明によれば、上記遺伝子導入用ベクター及びこれを保有する細胞を癌患者に投与して癌細胞の増殖抑制又は癌転移を抑制する癌治療組成物及び癌転移抑制組成物並びにかかる癌治療法及び癌転移抑制法が提供される。

第 7 に、本発明によれば、上記遺伝子治療用組成物の製造のための上記ベクター及び細胞の使用が提供される。

本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸などの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

以下、本発明pancpin遺伝子につき詳述すれば、該遺伝子は、セリン・プロテアーゼ・インヒビターであるセルピンに相同性を有する膵臓特異的癌関連遺伝子である。

本発明pancpin遺伝子によりコードされるpancpin蛋白質は、FASTAプログラム〔Person W. R., et al.,

Proc.Natl.Acad.Sci., USA., 85, 2444-2448 (1988)) を
利用したGenBank/EMBLデータベースによる検索の結果、
プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター - 2
(PAI - 2、炎症に関連) [Ye R. D., et al., J.
5 Biol.Chem., 262, 3718-3725 (1987)]、扁平上皮癌抗原
(扁平上皮癌を引き起こす) [Schneider S. S., et al.,
Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 92, 3147-3151 (1995)]、
単球／好中球エラスターゼ・インヒビター [Remold-
O'Donnel, E., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 89, 5635-
10 5639 (1992)] 及びマスピン (癌転移を抑制) [Zou Z.,
et al., Science, 263, 526-529 (1994)] と、それぞれ
33%、35%、36%及び30%同一であり、有意な
相同性が確認された。このことは、該pancpin蛋白質がセ
ルピン・ファミリー (オボアルブミン・ファミリー) の
15 新しいメンバーであることを示している。

しかして、膵臓癌は癌種の中では大変予後の不良な癌
であり、確定診断の下った大多数の患者は短期間のうち
に死に至る。該膵臓癌の重要な臨床の特徴はリンパ節と
遠隔器官への早期転移であるが、膵臓癌の正常組織や他
20 組織 (臓器) への高い浸潤能及び原発層からの脱離など
の高転移能の分子メカニズムは、まだよく判っていない。

本発明に係わるpancpin遺伝子は、本発明者らの研究の

結果、ほとんどの膵臓癌標本において、その発現が低下しており、更に、通常の癌組織には正常細胞も含まれている筈なので、正常膵臓組織での pancpin の高い発現を考えた場合、このドラスティックな癌標本での発現の減少は、癌細胞の周辺の正常細胞でも pancpin 遺伝子が減少していると考えられる。このことは、本発明 pancpin 遺伝子が正常細胞のフェノタイプを維持するために責任ある遺伝子のひとつであることを示唆している。

上記 pancpin 遺伝子は、主に正常膵臓に発現し、膵臓の癌細胞株や多くの膵臓癌標本においては発現しないという事実、並びに S S C P (single-strand conformation polymorphism) 及び D N A 配列の分析結果より、16 の膵臓癌標本からの腫瘍 D N A 間において2つのミスセンス変異の存在が確認されるという事実から、pancpin 遺伝子の不足は、膵臓癌の発生或は進展に対して重要な役割を演じる可能性が示唆され、この遺伝子は癌化における潜在的価値を有すると考えられる。

また、pancpin 蛋白質がセルピンと相同性を有するという事実は、pancpin 遺伝子が腫瘍細胞の成長と分裂において重要な役割を演じることを示唆している。このことは、セルピンが腫瘍の成長と分裂を抑制できるという事実、例えば、マスピンは当初正常ヒト乳房の上皮細胞におい

て発現した mRNA として定義されたが、浸潤性又は転移性の乳房癌において低下又は検出不可能なレベルであったという事実、これらの腫瘍細胞がマスピン cDNA によって形質転換されたならば、インビトロ及びインビボにおける乳房腫瘍細胞株の成長、運動性、侵襲性、転移性の特徴は減少するという事実から導くことができる。

本発明に係わる pancpin 蛋白質の機能の全貌は、尚充分には解明されていないが、pancpin 遺伝子のシグナル様配列に鑑み、また pancpin 遺伝子でコードされる蛋白質が分泌蛋白質であり、セルピン相同物であると考えられる点より、該蛋白質は、なんらかの成長調節経路、可能性としては成長抑制経路、において作用すると考えられる。また、本発明に係わる pancpin 遺伝子は、膵臓の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有することが期待できる。

以上のように、本発明に係わる pancpin 遺伝子及びその遺伝子産物は、殊に上記膵臓癌の解明、把握、診断、予防及び治療などに極めて有用な情報及び手段を与える。また、本発明遺伝子は、上記疾患の処置に利用される本発明遺伝子の発現を誘導する新薬などを開発する上でも好適に利用でき、個体或は組織における本発明遺伝子の発現又はその発現産物の検出や、該遺伝子の変異（欠失

や点変異)又は発現異常の検出などは、上記疾患の解明や診断上において好適に利用できると考えられる。

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「T S A 2 0 0 4」と名付けられたP C R産物
5 (pancpin遺伝子の断片、pancpinは全長1 2 1 5ヌクレオチド)のD N A配列から演繹されるものを挙げることであり、その塩基配列は配列番号：2に示されるとおりである。

本発明遺伝子は、具体的には配列番号：1で示される
10 4 0 5個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列の蛋白質をコードする塩基配列(その配列の具体例は配列番号：3に示される)を含む遺伝子、又は配列番号：2で示される塩基配列の全部或は一部を含むポリヌクレオチドからなる遺伝子として例示されるが、特にこれらに限定されることなく、例えば、上記特定のアミノ酸配列において一定の改変を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子
15 や、上記特定の塩基配列と一定の相同性を有する遺伝子であることができる。

即ち、本発明遺伝子には、配列番号：1に示されるア
20 ミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子もまた包含される。ここで、

「アミノ酸の欠失、置換又は付加」の程度及びそれらの位置などは、改変された蛋白質が、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と同様の機能乃至作用を有する同効物であれば特に制限されない。具体的には、
5 脾臓の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有するものが挙げられる。

尚、これらアミノ酸配列の改変（変異）などは、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾などにより生じることもあり、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具
10 体例遺伝子）に基づいて人為的にこれらを行わせることもできる。本発明は、このような改変・変異の原因及び手段を問わず、上記特性を有する全ての改変遺伝子を包含するものである。

上記の人為的手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 15 154: 350, 367-382 (1987); 同 100: 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984); 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)〕などの遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン
20 酸アミダイト法などの化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967); 同 91: 3350 (1969); Science, 150: 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22: 1859 (1981); 同

24: 245 (1983)] 及びそれらの組合せ方法などが例示できる。

本発明遺伝子のひとつの態様である配列番号：3で示される塩基配列は、上記アミノ酸配列（配列番号：1）
5 の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例でもある。本発明遺伝子はこの組合せ例の配列に限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ選択した塩基配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は、
常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用
10 頻度などを考慮することができる〔Nucleic Acids Res.,
9: 43 (1981)〕。

また、本発明遺伝子は、配列番号：2の具体例で示されるように、一本鎖DNAの塩基配列として表示されるが、本発明はかかる塩基配列に相補的な塩基配列からなる
15 ポリヌクレオチドやこれらの両者を含むコンポーネントも当然に包含する。また、cDNAなどのDNAに限定されることもない。

更に、本発明遺伝子は、前記のとおり、配列番号：2に示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオ
20 チドからなるものに限定されず、当該塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものであってもよい。かかる遺伝子としては、少なくとも、下記に掲げるよう

なストリンジェントな条件下で、配列番号：2で示される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、一定の条件下で洗浄してもこれより脱離しないものが挙げられる。

- 5 即ち、配列番号：2の塩基配列を有するDNAと、 $6 \times \text{SSC}$ 中 65°C 一夜の条件下或は 50% ホルムアミドを含む $4 \times \text{SSC}$ 中 37°C 一夜の条件下においてハイブリダイズし、 $2 \times \text{SSC}$ 中 65°C 30分間の洗浄条件下においても該DNAから脱離しない塩基配列を有する遺
10 伝子が例示される。ここで、SSCは、標準食塩－クエン酸緩衝液である（standard saline citrate; $1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}$, $0.015\text{M sodium citrate}$ ）。

- 上記特定DNAと相同性を有する塩基配列からなる本発明遺伝子、即ち特定DNAとハイブリダイズし、一定
15 条件下での洗浄によってもこれより脱離しない塩基配列の本発明遺伝子は、より好ましくは、特定DNAによりコードされる蛋白質が有する活性と同様の活性、即ち腫瘍の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有する蛋白質をコードしているものであるのがよい。

- 20 本発明遺伝子は、その具体例についての配列情報に基づいて、一般的な遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる〔例えばMolecular Cloning 2nd

Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) など参照]。

- 5 具体的には、本発明遺伝子の製造は、該遺伝子を保有する適当な起源より常法に従って c D N A ライブラリーを調製し、該ライブラリーから本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78: 6613 (1981); Science, 222: 778 (1983) など]。
- 10 上記において、c D N A の起源としては、本発明遺伝子を発現し得る各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞など、特に脾臓組織が例示される。これらからの全 R N A の分離、m R N A の分離や精製、c D N A の取得とそのクローニングなどは、いずれも常法に従い実施
- 15 できる。尚、c D N A ライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれら市販の c D N A ライブラリー、例えばクローンテック社 (Clontech Lab. Inc.) より市販の各種 c D N A ライブラリーなどを用いることもできる。

- 本発明遺伝子を c D N A ライブラリーからスクリーニ
- 20 ングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えば c D N A により産生される蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニング

により対応する c D N A クローンを選択する方法、目的の D N A 配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションなどやこれらの組合せなどを例示できる。

- 5 ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子の塩基配列に関する情報を基にして化学合成された D N A などが一般的に例示できるが、勿論既に取得された本発明遺伝子そのものやその断片なども良好に利用できる。
- また、本発明遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセ
- 10 ンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとすることもできる。

- 本発明遺伝子をスクリーニングする方法は、上記特異抗体に代えて pancpin 蛋白質を利用した、蛋白質相互作用クローニング法 (protein interaction cloning
- 15 procedure) によることもできる。

- 本発明では、またディファレンシャル ディスプレイ法 [differential display method, Liand P., et al., Science, 257, 967-971 (1992)] によって、異なる条件下の細胞もしくは複数の異なる細胞群間の m R N A の発
- 20 現を直接比較、検討することができる。

本発明遺伝子の取得に際しては、P C R 法 [Science, 230: 1350 (1985)] による D N A / R N A 増幅法も好適

に利用できる。殊に、ライブラリーから全長の c D N A
が得られ難いような場合には、レース法〔RACE: Rapid
amplification of cDNA ends; 実験医学、12(6): 35
(1994)〕、殊に 5' - レース (5'-RACE) 法〔Proc. Nat
5 1. Acad. Sci., USA., 8: 8998 (1988)〕などの採用が好
適である。かかる P C R 法の採用に際して使用されるプ
ライマーは、既に本発明によって明らかにされた本発明
遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法
に従い合成できる。

10 尚、増幅させた D N A / R N A 断片の単離精製は、前
記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法
などによればよい。

本発明遺伝子は、慣用される D N A 合成技術、例えば
前述したリン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法な
15 どの化学合成手段に従って、製造・取得することもでき
る。かかる化学合成は、例えば市販されている自動オリ
ゴヌクレオチド合成装置を用いて行うことができる。二
本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖を共
にアニーリングさせるか、または適当なプライマー配列
20 と共に D N A ポリメラーゼを用い相補鎖を付加するかに
より、化学合成した一本鎖生成物から得ることができる。

上記で得られる本発明遺伝子或は各種 D N A 断片は、

常法、例えばジデオキシ法〔Proc.Natl.Acad.Sci., USA.,
74: 5463 (1977)〕やマキサムーギルバート法〔Method
in Enzymology, 65: 499 (1980)〕などに従って、また
簡便には市販のシーケンスキットなどを用いて、その
5 塩基配列を決定することができる。

本発明遺伝子の利用によれば、一般の遺伝子工学的手法を用いることにより、その遺伝子産物を容易に大量に安定して製造することができる。従って、本発明は、本
10 発明にかかるpancpin遺伝子を含有するベクター（発現ベクター）及び該ベクターによって形質転換された宿主細胞並びに該宿主細胞を培養することによりpancpin蛋白質を製造する方法をも提供するものである。

該pancpin蛋白質の製造方法は、通常の遺伝子組換え技術〔Science, 224: 1431 (1984); Biochem.Biophys.Res.
15 Comm., 130: 692 (1985); Proc.Natl.Acad.Sci., USA., 80: 5990 (1983)及び前記引用文献など参照〕に従って実施することができる。

上記宿主細胞としては、原核生物及び真核生物のいずれも用いることができる。例えば原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌などの一般的に用いられるものが広く挙げられるが、好適には大腸菌、とりわけエシェリヒ
20 ア・コリ (Escherichia coli) K 1 2 株が例示できる。

また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵母などの細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの細胞である C O S 細胞 [Cell, 23: 175 (1981)] やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ
5 欠損株 [Proc.Natl.Acad.Sci., USA., 77: 4216 (1980)]
などが、後者としては、サッカロミセス属酵母細胞などが好適に用いられているが、これらに限定される訳ではない。

原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複
10 製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及び S D (シャイン・アンド・ダルガーノ) 塩基配列、更に蛋白質合成開始に必要な開始コドン (例えば A T G)
を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベ
15 クターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例えば p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p U C 1 2、
p U C 1 3 などがよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種のベクターを利用することができる。大腸菌を利用した発現系に利用される上記ベクターの市販品
20 としては、例えば p G E X - 4 T (Amersham Pharmacia Biotech社)、p M A L - C 2、p M A L - P 2 (以上 New England Biolabs社)、p E T 2 1 (Invitrogen社)、

p B A D / H i s (Invitrogen社)などを例示できる。

- 脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとする本発明遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアダ
5 ニル化部位及び転写終了配列などを保有するものが挙げられ、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、具体的には、例えば S V 4 0 の初期プロモーターを保有する p S V 2 dhfr [Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)]などが例示できる。
- 10 これ以外にも既知の各種の市販ベクターを用いることができる。動物細胞を利用した発現系に利用される市販ベクターの例としては、例えば p E G F P - N, p E G F P - C (以上Clontech社)、p I N D (Invitrogen社)、p c D N A 3: 1 / H i s (Invitrogen社)などの動物
15 細胞用ベクターや、p F a s t B a c H T (Gibco BRL社)、p A c G H L T (PharMingen社)、p A c 5 / V 5 - H i s, p M T / V 5 - H i s, p M T / B i p / V 5 - H i s (以上Invitrogen社)などの昆虫細胞用ベクターなどが挙げられる。
- 20 また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有する p A M 8 2 [Proc. Natl. Acad.

Sci., USA., 80: 1 (1983))などを例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えば p P I C Z, p P I C Z α (以上 Invitrogen 社) などが包含される。

プロモーターとしても特に限定なく、エッシェリヒア属菌を宿主とする場合には、例えばトリプトファン(trp)プロモーター、lppプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PL/PRプロモーターなどを好適に利用できる。宿主がバチルス属菌である場合は、例えば SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。酵母を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、例えば pH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどを例示できる。また、動物細胞を宿主とする場合には、例えば SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオールインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが好適なものとして例示できる。

尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白質発現ベクターも好ましく利用でき、該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質として発現させるための p G E X (Promega 社)などを例示できる。

上記所望の組換えDNA（発現ベクター）の宿主細胞への導入方法・形質転換法にも特に制限はなく、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体も、常法に従い培養することができ、該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的のpancpin蛋白質が発現・産生され、形質転換体の細胞内、細胞外若しくは細胞膜上に蓄積もしくは分泌される。

上記培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

かくして得られる組換え蛋白質（pancpin蛋白質）は、所望により、その物理的性質、化学的性質などを利用した各種の分離操作に従って分離、精製することができる
〔「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；

Biochemistry, 25(25): 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163: 313 (1987) など参照〕。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白質沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグ

ラフィー（HPLC）などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどが挙げられ、特に好ましい上記方法としては、pancpin蛋白質の特異抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティクロマトグラフィーを例示できる。

しかして、本発明は、例えば上記の如くして得られる、新規なpancpin蛋白質自体をも提供するものである。該蛋白質は、膵臓の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有することにより特徴付けられ、前記のとおり医薬分野において有用である。

また、このpancpin蛋白質は、該蛋白質の特異抗体、即ち抗pancpin抗体を作成するための免疫抗原としても利用できる。ここで抗原として用いられるコンポーネントは、例えば上記遺伝子工学的手法に従って大量に産生された蛋白質或はそのフラグメントであることができ、これらの抗原を利用することにより、所望の抗血清（ポリクローナル抗体）及びモノクローナル抗体を取得することができる。

該抗体の製造方法自体は、当業者によく理解されているところであり、本発明においてもこれら常法に従うことができる〔続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）など参照〕。

例えば、抗血清の取得に際して利用される免疫動物としては、ウサギ、モルモット、ラット、マウスやニワトリなどの通常動物を任意に選択でき、上記抗原を使用する免疫方法や採血などもまた常法に従い実施できる。

- 5 また、モノクローナル抗体の取得も、常法に従い、上記免疫抗原で免疫した動物の形質細胞（免疫細胞）と形質細胞腫細胞との融合細胞を作成し、これより所望抗体を産生するクローンを選択し、該クローンの培養により実施することができる。免疫動物は、一般に細胞融合に
10 使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択され、通常マウスやラットなどが有利に用いられる。免疫は、上記抗血清の場合と同様であり、所望により通常のアジュバントなどと併用して行うこともできる。

- 尚、融合に使用される形質細胞腫細胞としても、特に、
15 限定なく、例えば p 3 (p3/x63-Ag8) [Nature, 256: 495-497 (1975)]、p 3 - U 1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7 (1978)]、N S - 1 [Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976)]、M P C - 1 1 [Cell, 8: 405-415 (1976)]、S P 2 / 0
20 [Nature, 276: 269-271 (1978)] など、ラットにおける R 2 1 0 [Nature, 277: 131-133 (1979)] など及びそれらに由来する細胞などの各種の骨髓腫細胞をいずれも使

用できる。

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）やセンドイウイルス（HVJ）などの存在下に公知の方法
5 に準じて行うことができ、所望のハイブリドーマの分離もまた同様に行い得る〔Meth. in Enzymol., 73: 3（1981）；上記続生化学実験講座など〕。

また、目的とする抗体産生株の検索及び単一クローン化も常法により実施され、例えば抗体産生株の検索は、
10 上記免疫抗原を利用したELISA法〔Meth. in Enzymol., 70: 419-439（1980）〕、プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクテロニー（Ouchterlony）法、ラジオイムノアッセイなどの一般に抗体の検出に用いられている種々の方法に従い実施することができる。

15 かくして得られるハイブリドーマからの本発明抗体の採取は、該ハイブリドーマを常法により培養してその培養上清として得る、また、ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水として得る方法などにより実施される。前者の方法は、高純度の
20 抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。このようにして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィーな

どの通常的手段により精製することができる。

かくして得られる抗体は、本発明の pancpin 蛋白質に結合性を有することによって特徴付けられ、これは、前述した pancpin 蛋白質の精製及びその免疫学的手法による測定乃至識別などに有利に利用できる。本発明は、かかる新規な抗体をも提供するものである。

また、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の発現の検出を行うことができる。

かかる検出は常法に従って行うことができ、例えば R T - P C R [Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E.S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)] による R N A 増幅やノーザンブロット解析 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)]、in situ R T - P C R [Nucl. Acids Res., 21: 3159-3166 (1993)] や in situ ハイブリダイゼーションなどの細胞レベルでのそれら測定、N A S B A 法 [Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350: 91

-92 (1991)) 及びその他の各種方法によりいずれも良好に実施し得る。

尚、R T - P C R 法を採用する場合において、用いられるプライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる該遺伝子特有のものである限り何等限定されず、本発明の遺伝情報に基いてその配列を適宜設定することができる。通常、これは20～30ヌクレオチド程度の部分配列を有するものとすることができる。

このように、本発明は、本発明pancpin遺伝子の検出用の特異プライマー及び／又は特異プローブとして使用されるDNA断片をも提供するものである。

以下、本発明に係る遺伝子治療のための遺伝子導入用ベクター、これを保有する細胞、これらを利用する遺伝子治療用組成物及び遺伝子治療法につき詳述する。

尚、本発明に係る遺伝子導入用ベクター、細胞、遺伝子治療用組成物などの製造やこれらを利用した遺伝子治療に際しては、特記しないかぎり、化学、薬学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学及び免疫学の慣用的な方法を利用することができる。これらの方法の例としては、以下の文献に記載のものを挙げるることができる。

・マニアティス〔Maniatis, T., et al., Molecular

- Cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982))、
- ・ サムブルック [Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1981))、
 - ・ アウスベル [Ausbel, F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992))、
 - 10 ・ グローバー [Glover, D., DNA Cloning, I and II (Oxford Press) (1985))、
 - ・ アナンド [Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press (1992))、
 - ・ グスリー [Guthrie, G., et al., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, (Academic Press) (1991)) 及び
 - 15 ・ フィンク [Fink, et al., Hum. Gene Ther., 3, 11-19 (1992)) など。

本発明に係る pancpin 遺伝子を含む遺伝子導入用ベ

20 クターの一例としては、前述した pancpin 蛋白質の発現ベクターを挙げることができる。かかる遺伝子導入用ベクター及びこれを保有する細胞の具体例は、後記実施例 2

に示されるとおりであり、これらは各種の遺伝子治療、特に、膵臓の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制するための処置に有効である。

本発明遺伝子導入用ベクターは、適当なプロモーター、
5 5' mRNAリーダ配列、開始部位、導入されるべき
遺伝子配列を含む核酸配列（pancpin遺伝子配列）、3'
非翻訳領域、ポリアデニール化シグナルなどを機能的に
適当な距離で順列的に結合されたウイルス性乃至非ウイ
ルス性のベクターであることができる。

10 本発明遺伝子治療法は、例えば本発明遺伝子導入用ベ
クターを標的とする膵臓癌細胞などの適当な細胞に感染
・導入させることにより実施され、かくして所望の癌細
胞の増殖抑制及び癌転移の抑制を行うことができる。

本発明に係るpancpin遺伝子を含有する遺伝子導入用ベ
15 クターを利用した上記遺伝子治療法は、変異pancpin対立
遺伝子を有する細胞に、野生型pancpin機能を供給する方
法としてとらえることができる。かかる機能を細胞に供
給すれば、受容細胞／標的細胞の新生物増殖が抑制され
る。上記野生型pancpin遺伝子（又は該遺伝子の一部）は、
20 当該遺伝子を染色体外に維持するようなベクター（本発
明ベクター）を用いて細胞に導入することができる。こ
の場合、当該遺伝子は、染色体外から発現される。

また、変異pancpin対立遺伝子を有する細胞に、当該遺伝子を導入して発現させる場合、当該遺伝子は細胞の非腫瘍的増殖に必要なpancpin蛋白質の一部分をコードしていることが重要な要件である。

- 5 野生型pancpin遺伝子又はその一部分は、細胞に存在する内因的な突然変異pancpin遺伝子との組換えが起こるように、突然変異細胞に導入するのが好ましい。このような組換えには、pancpin遺伝子突然変異が修正される二重組換えの発生が必要とされる。かかる組換え及び染色体
- 10 外維持の双方のための所望遺伝子導入用のベクター（起源ベクター）は、後述するように、当該分野において既に知られている。本発明ではかかる既知の遺伝子導入用ベクターに本発明pancpin遺伝子を導入して使用することができる。
- 15 本発明遺伝子導入用ベクターの、上記変異対立遺伝子を有する細胞、患者癌細胞などの適当な細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、ウイルス形質導入などを始めとする、細胞にDNA
- 20 を導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従って行うことができる。かくして、野生型pancpin遺伝子で形質転換した細胞は、癌の抑制乃至癌転移の抑制のための医薬や、治療研究のためのモデル系として利

用することができる。

本発明遺伝子導入用ベクターを利用した本発明遺伝子
治療法は、より詳しくは、発現制御エレメントに連結し
た pancpin 遺伝子のコピーを含み、かつ患者の腫瘍細胞内
5 で当該遺伝子産物を発現できるウイルスまたはプラスミ
ドベクター（本発明遺伝子導入用ベクター）を作成して、
これを患者の腫瘍細胞内に導入することにより実施でき
る。

ここで本発明遺伝子導入用ベクターの作成のために用
10 いられる適当な起源ベクターとしては、特に限定されな
いが、例えば米国特許第 5 2 5 2 4 7 9 号明細書及び
P C T 国際公開 W O 9 3 / 0 7 2 8 2 号明細書に開示さ
れたベクターを使用することができる。所望のベクター
は常法に従い、例えば上記の特許明細書及び公開明細書
15 の記載に従って作成することができる。

pancpin 遺伝子またはその断片を含む本発明遺伝子導入
用ベクターの患者腫瘍細胞内への導入は、患者の腫瘍部
位への局所的または全身的注射投与により実施すること
ができる。上記全身的投与によれば、他の部位に転移し
20 得るいずれの腫瘍細胞にも到達させることができる。尚、
導入された形質導入遺伝子が各標的腫瘍細胞の染色体に
恒久的に取り込まれない場合には、該投与を定期的に繰

り返せばよい。

本発明に係る遺伝子治療法は、上記の如く遺伝子導入用のベクター又は細胞を、直接体内に投与するインビボ（in vivo）法と、患者の体内より一旦標的とする細胞を
5 取出して体外で遺伝子を導入して、その後、該細胞を体内に戻すエクスビボ（ex vivo）法との両者の方法を包含する。

尚、本発明の特定遺伝子を利用する遺伝子治療（或は処置）においては、必ずしも特定遺伝子の全て、即ち全
10 配列からなる遺伝子が必要とされることはなく、例えば該遺伝子の所望機能と実質的に同質な機能を保持する限りにおいて、前記した改変体或は一部配列からなる遺伝子を使用することもできる。

本発明のpancpin遺伝子を含有する遺伝子導入用ベクター
15 一及び該ベクターによりpancpin遺伝子が導入された細胞を有効成分とする遺伝子治療用組成物は、特に癌をその適用対象とするが、遺伝子治療の対象には、該癌以外にも、遺伝子標識を始め、遺伝性疾患やA I D Sのようなウイルス疾患が包含される。また、遺伝子導入のための
20 標的細胞は、遺伝子治療の対象により適宜選択できる。

これには、癌細胞や腫瘍組織以外に、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞、脾臓、甲状腺の如き分泌細

胞などが包含される。

本発明遺伝子治療のための pancpin 遺伝子の細胞内への導入方法には、ウイルス的方法及び非ウイルス的方法がある。ウイルス的方法としては、pancpin 遺伝子が正常細胞に発現する外来遺伝子であることに鑑みて、ベクターとして本発明 pancpin 遺伝子を導入した例えばレトロウイルスベクターを用いる方法を挙げることができる。上記レトロウイルスベクター以外のウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクター、H I V ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V, adeno-associated virus)、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス (H S V) ベクター、エプスタイン-バーウイルス (E B V, Epstein-Barr virus) ベクターなども、本発明遺伝子を細胞内に導入するためのベクターとして利用

5

10

15

非ウイルス的な遺伝子導入の方法としては、リン酸カルシウム共沈法；D N A を封入したりポソームと予め紫外線で遺伝子を破壊した不活性化センダイウイルスを融合させて膜融合リポソームを作成し、細胞膜と直接融合させて D N A を細胞内に導入する膜融合リポソーム法

20

[Kato, K., et al., J. Biol. Chem., 266, 22071-22074 (1991)] ; プラスミド D N A を金でコートして高圧放電

- によって物理的に細胞内にDNAを導入する方法〔Yang, N.S., et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 87, 9568-9572 (1990)〕；プラスミドDNAを直接インビボで臓器や腫瘍に注入するネイキッド(naked)DNA法〔Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1467 (1990)〕；多重膜正電荷リポソームに包埋した遺伝子を細胞に導入するカチオニック・リポソーム法〔八木国夫, 医学のあゆみ, Vol. 175, No.9, 635-637 (1995)〕；特定細胞のみに遺伝子を導入し、他の細胞に入らないようにするために、
- 10 目的とする細胞に発現するレセプターに結合するリガンドをDNAと結合させてそれを投与するリガンド-DNA複合体法〔Frindeis, et al., Trends Biotechnol., 11, 202 (1993); Miller, et al., FASEB J., 9, 190 (1995)〕などを挙げるができる。
- 15 上記リガンド-DNA複合体法には、例えば肝細胞が発現する糖蛋白質レセプターをターゲットとして糖蛋白質をリガンドとして用いる方法〔Wu, et al., J.Biol.Chem., 266, 14338 (1991); Ferkol, et al., FASEB J., 7, 1081-1091 (1993)〕や、腫瘍細胞が強く発現している
- 20 転スフェリン・レセプターを標的として転スフェリンをリガンドとして用いる方法〔Wagner et al., Proc.Natl.Acad.Sci., USA., 87, 3410 (1990)〕などが

含まれる。

また本発明に係る遺伝子治療のための遺伝子導入法は、上記の如き各種の生物学的及び物理学的な遺伝子導入法を組合せたものであってもよい。該組合せによる方法として、例えばあるサイズのプラスミドDNAをアデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン抱合抗体と組合せる方法を例示できる。該方法によれば、得られる複合体がアデノウイルスベクターに結合し、かくして得られる三分子複合体を細胞に感染させることにより本発明遺伝子の導入を行い得る。この方法では、アデノウイルスベクターにカップリングしたDNAが損傷される前に、効率的な結合、内在化及びエンドソーム分解が可能となる。また、前記リポソーム／DNA複合体は、直接インビボにて遺伝子導入を媒介できる。

以下、本発明遺伝子導入用ウイルスベクターの作成並びに標的細胞又は組織への遺伝子導入の各方法につき、詳述する。

レトロウイルスベクターを利用する方法において、用いられるベクターの代表例としては、例えばマウスの白血病ウイルスを起源とするレトロウイルス〔McLachlin, J. R., et al., Proc. Natl. Acad. Res. Molec. Biol., 38, 91-135 (1990)〕を例示できる。

- 上記方法におけるレトロウイルスベクター・システムは、上記文献に記載されているように、ウイルスベクターとヘルパー細胞（パッケージング細胞）とからなっている。ここでヘルパー細胞は、レトロウイルスの構造蛋白質 *g a g*（ウイルス粒子内の構造蛋白質）、*p o l*（逆転写酵素）、*e n v*（外被蛋白質）などの遺伝子を予め発現しているが、ウイルス粒子を生成していない細胞を言う。一方、ウイルスベクターは、パッケージングシグナルや *L T R* (*long terminal repeats*) を有している
- 5 蛋白質 *g a g*（ウイルス粒子内の構造蛋白質）、*p o l*（逆転写酵素）、*e n v*（外被蛋白質）などの遺伝子を予め発現しているが、ウイルス粒子を生成していない細胞を言う。一方、ウイルスベクターは、パッケージングシグナルや *L T R* (*long terminal repeats*) を有している
- 10 が、ウイルス複製に必要な *g a g*、*p o l*、*e n v* などの構造遺伝子を持っていない。パッケージングシグナルはウイルス粒子のアセンブリーの際にタグとなる配列で、選択遺伝子（*n e o*、*h y g*）とクローニングサイトに組込まれた所望の導入遺伝子（*pancpin* 遺伝子）がウイルス
- 15 ス遺伝子の代りに挿入される。ここで高力価のウイルス粒子を得るにはインサートを可能な限り短くし、パッケージングシグナルを *g a g* 遺伝子の一部を含め広くとることと、*g a g* 遺伝子の *A T G* を残さぬようにすることが重要である。
- 20 所望の外来遺伝子を組み込んだベクター *D N A* をヘルパー細胞に移入することによって、ヘルパー細胞が作っているウイルス構造蛋白質によりベクターゲノム *R N A*

がパッケージされてウイルス粒子が形成され、分泌される。組換えウイルスとしてのウイルス粒子は、標的細胞に感染した後、ウイルスゲノムRNAから逆転写されたDNAが細胞核に組み込まれ、ベクター内に挿入された

5 遺伝子が発現する。

尚、所望の遺伝子の導入効率を上げる方法として、フィブロネクチンの細胞接着ドメインとヘパリン結合部位と接合セグメントとを含む断片を用いる方法

[Hananberg, H., et al., Exp.Hemat., 23, 747 (1995)]

10 を採用することもできる。

アデノウイルスベクターを利用する方法につき詳述すれば、該アデノウイルスベクターの作成は、バークネル

[Berkner, K.L., Curr.Topics Microbiol.Immunol., 158, 39-66 (1992)]、瀬戸口康弘ら [Setoguchi, Y.,

15 et al., Blood, 84, 2946-2953 (1994)]、鐘力江裕美ら

[実験医学, 12, 28-34 (1994)] 及びケナーら [Ketner, G., et al., Proc.Natl.Acad.Sci., USA., 91, 6186-6190 (1994)] の方法に準じて実施できる。

例えば、非増殖性アデノウイルスベクターを作成する

20 には、まずアデノウイルスの初期遺伝子のE1及び/又はE3遺伝子領域を除去する。次に、目的とする所望の外来遺伝子発現単位(目的とする導入遺伝子、即ち

- pancpin遺伝子、その遺伝子を転写するためのプロモーター、転写された遺伝子の安定性を賦与するポリAから構成）及びアデノウイルスゲノムDNAの一部を含むプラスミドベクターと、アデノウイルスゲノムを含むプラスミドとを、例えば293細胞に同時にトランスフェクション
- 5 する。この2者間で相同性組換えを起こさせて、遺伝子発現単位とE1とを置換することにより、所望の遺伝子を包含する本発明遺伝子導入用ベクターである非増殖性アデノウイルスベクターを作成することができる。また、
- 10 コスミドベクターにアデノウイルスゲノムDNAを組み込んで、末端蛋白質を付加した3'側アデノウイルスベクターを作成することもできる。更に組換えアデノウイルスベクターの作成には、YACベクター（特表平8-510651号公報参照）も利用可能である。
- 15 アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターにつき概略すると、例えば小澤敬也、医学のあゆみ、Vol.175, No.9, 619-622(1995)に記載されているように、該AAVはアデノウイルスの培養系に混入してくる小型のウイルスとして発見された。これには、ウイルス複製にヘルパーウ
- 20 イルスを必要とせず宿主細胞内で自律的に増殖するパルボウイルス属と、ヘルパーウイルスを必要とするディペンドウイルス属の存在が確認されている〔Kotin, R. M.

and Berns, K. I., *Virology*, 170, 460-467 (1989)]。

該 A A V は宿主域が広く種々の細胞に感染するありふれたウイルスであり、ウイルスゲノムは大きさが 4 6 8 0 塩基の線状一本鎖 D N A からなり、その両端の 1 4 5 塩基が I T R (inverted terminal repeat) と呼ばれる特徴的な配列を持って存在している。この I T R の部分が複製開始点となり、プライマーの役割をなす。更にウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体 D N A への組込みにも、該 I T R が必須となる。また、ウイルス

5 蛋白質に関しては、ゲノムの左半分が非構造蛋白質、即ち複製や転写をつかさどる調節蛋白質の R e p をコードしている。

組換え A A V の作成は、A A V が染色体 D N A に組み込まれる性質を利用して行うことができ、かくして本発明の遺伝子導入用ベクターが作成できる。この方法は、例えば文献記載の方法 [Nienhuis, A. W., et al., *Viruses and Bone Marrow* (ed. by Young, N. S.), Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 351-414; Ferrari, F. K., et al., *J. Virol.*, 70, 3227-3234 (1996) など] に従って実施

15 できる。即ち、まず野生型 A A V の 5' と 3' の両端の

I T R を残し、その間に所望の導入用遺伝子 (pancpi n 遺伝子) を挿入したプラスミド (A A V ベクタープラス

20

ミド)を作成する。一方、ウイルス複製やウイルス粒子の形成に必要とされるウイルス蛋白質は、別のヘルパープラスミドにより供給させる。この両者の間には共通の塩基配列が存在しないようにし、遺伝子組換えによる野生型ウイルスが出現しないようにする必要がある。その後、両者のプラスミドを例えば293細胞へのトランスフェクションにより導入し、更にヘルパーウイルスとしてアデノウイルス(293細胞を用いる場合は非増殖型のものでもよい)を感染させると、非増殖性の所望の組換えAAVが産生される。続いて、この組換えAAVは核内に存在するので、細胞を凍結融解して回収し、混入するアデノウイルスを56℃加熱により失活させる。更に必要に応じて塩化セシウムを用いる超遠心法により組換えAAVを分離濃縮する。上記の如くして所望の遺伝子導入用の組換えAAVを得ることができる。

HIVベクターの作成は、例えば島田らの方法に準じて行うことができる〔Shimada, T., et al., J.Clin. Invest., 88, 1043-1047 (1991)〕。

即ち、HIVウイルスはCD4をレセプターとしてヘルパーT細胞に特異的に感染するので、その利用によれば、ヒトCD4陽性細胞に特異的に遺伝子導入の可能な組織特異的遺伝子導入ベクターとしてのHIVベクター

を作成することができる。

組換えH I Vベクターの作成は、例えばまずパッケージングプラスミドであるC G P Eをg a g、p o l、e n vの構造遺伝子とこれらの発現に必要な調節遺伝子
5 (t a t、r e vなど)をサイトメガロウイルス(C M V)のプロモーターとヒトグロビン遺伝子のポリAシグナル(poly A)により発現するように作成する。次にベクタープラスミドH X Nを、H I Vの両L T Rの間に、標識遺伝子としてチミジンキナーゼ(T K)のプロモーターを
10 もつバクテリアのネオマイシン耐性遺伝子(neoR)を挿入し、さらに基本となるプラスミドベクターにS V 4 0の複製起点を挿入することにより、C O S細胞内で効率よく増殖できるように構築できる。例えば、これらのパッケージングプラスミドであるC G P EとベクタープラスミドH X Nを同時にC O S細胞にトランスフェクション
15 させることにより大量のネオマイシン耐性遺伝子(neoR)が組み込まれた所望の組換えウイルスを作成し、培養培地中に放出させることができる。

ここでパッケージングプラスミドC G P Eは、g a g、
20 p o l、e n vの構造遺伝子とこれらの発現に必要な調節遺伝子(t a t、r e v)をサイトメガロウイルスのプロモーター(C M V)とヒトグロビン遺伝子のポリA

シグナル (poly A) により発現するように作成したものである。またベクタープラスミド HXN は、HIV の両LTR間に標識遺伝子としてチミジンキナーゼのプロモーター (TK) を有するネオマイシン耐性遺伝子が
5 挿入されたプラスミドである〔三宅弘一、島田隆、医学のあゆみ、Vol.175, No.9, pp.623-624(1995)〕。

EBVベクターの製造は、例えば清水らの方法に準じて行うことができる〔清水則夫ら、細胞工学, 14(3), 280-287 (1995)〕。

- 10 本発明遺伝子導入用ベクターとしてのEBVベクターの製造につき概略すると、EBウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) は、1964年にエプスタイン (Epstein) らによりバーキット (Burkitt) リンパ腫由来の培養細胞より分離されたヘルペス科に属するウイルスである〔Kieff,
15 E. and Liebowitz, D.: Virology, 2nd ed. Raven Press, New York, 1990, pp.1889-1920〕。該EBVには細胞をトランスフォームする活性があるので、遺伝子導入用ベクターとするためには、このトランスフォーム活性を欠いたウイルスを調製しなければならない。これは
20 次の如くして実施できる。

即ちまず、所望の外来遺伝子 (pancpin遺伝子) を組み込むための標的DNA近傍のEBVゲノムをクローニン

グする。そこに外来遺伝子のDNA断片と薬剤耐性遺伝子を組み込み、組換えウイルス作製用ベクターとする。次いで適当な制限酵素により切り出された組換えウイルス作製用ベクターをEBV陽性Akata細胞にトランス

5 フェクトする。相同組換えにより生じた組換えウイルスは、抗細胞表面免疫グロブリン抗体処理によるウイルス産生刺激により、野生型AkataEBVとともに回収できる。これをEBV陰性Akata細胞に感染し、薬剤存在下で耐性株を選択することにより、野生型EBV

10 が共存しない所望の組換えウイルスのみが感染したAkata細胞を得ることができる。更に組換えウイルス感染Akata細胞にウイルス活性を誘導することにより、目的とする大量の組換えウイルスベクターを産生することができる。

15 組換えウイルスベクターを用いることなく所望の遺伝子を標的細胞に導入する、非ウイルスベクターの製造は、例えば膜融合リポソームによる遺伝子導入法により実施することができる。該方法は、膜リポソーム（脂質二重膜からなる小胞）に細胞膜への融合活性をもたせること

20 により、リポソームの内容物を直接細胞内に導入する方法である。

上記膜融合リポソームによる遺伝子の導入は、例えば

中西らの方法によって行うことができる〔Nakanishi, M.,
et al., Exp. Cell Res., 159, 399-499 (1985);
Nakanishi, M., et al., Gene introduction into
animal tissues. In Trends and Future Perspectives
5 in Peptide and Protein Drug Delivery (ed. by Lee,
V.H. et al.), Harwood Academic Publishers GmbH, A
msterdam, 1995, pp.337-349〕。

以下、該膜融合リポソームによる遺伝子の導入法につ
き概略する。即ち、紫外線で遺伝子を不活性化したセン
10 ダイウイルスと所望の遺伝子や蛋白質などの高分子物質
を封入したリポソームを37℃で融合させる。この膜融
合リポソームは、内側にリポソーム由来の空洞、外側に
ウイルス・エンベロープと同じスパイクがある疑似ウイ
ルスともよばれる構造を有している。更にショ糖密度勾
15 配遠心法で精製後、標的とする培養細胞又は組織細胞に
対して膜融合リポソームを4℃で吸着させる。次いで、
37℃にするとリポソームの内容物が細胞に導入され、
所望の遺伝子を標的細胞に導入できる。ここでリポソー
ムとして用いられる脂質としては、50%（モル比）コ
20 レステロールとレシチン及び陰電荷をもつ合成リン脂質
で、直径300nmの1枚膜リポソームを作製して使用
するのが好ましい。

また、別のリポソームを用いて遺伝子を標的細胞に導入する方法としては、カチオニック・リポソームによる遺伝子導入法を挙げることができる。該方法は、八木らの方法に準じて実施できる〔Yagi, K., et al., B.B.R.C., 196, 1042-1048 (1993)〕。この方法は、プラスミドも細胞も負に荷電していることに着目して、リポソーム膜の内外両面に正の電荷を与え、静電気によりプラスミドの取り込みを増加させ、細胞との相互作用を高めようとするものである。ここで用いられるリポソームとして

5 C., 196, 1042-1048 (1993)〕。この方法は、プラスミドも細胞も負に荷電していることに着目して、リポソーム膜の内外両面に正の電荷を与え、静電気によりプラスミドの取り込みを増加させ、細胞との相互作用を高めようとするものである。ここで用いられるリポソームとして

10 は、正荷電を有する多重膜の大きなリポソーム (multilamellar large vesicles: MLV)が有用であるが、大きな1枚膜リポソーム (large unilamellar vesicles: LUV)や、小さな1枚膜リポソーム (small unilamellar vesicles: SUV)を使用してプラスミドとの複合体を作製

15 し、所望の遺伝子を導入することも可能である。

プラスミド包埋カチオニックMLVの調製法について概略すると、まず脂質TMAG (N-(α -trimethylammonio-acetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride)、DLPC (dilauroyl phosphatidylcholine) 及びDOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine) をモル比が1 :

20 2 : 2となる割合で含むクロロホルム溶液(脂質濃度として1 mM)を調製する。次いで総量1 μ molの脂質をスピッ

ツ型試験管に入れ、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを減圧除去して脂質薄膜を調製する。更に減圧下にクロロホルムを完全に除去し乾燥させる。次いで20 μ gの遺伝子導入用プラスミドを含む0.5mlのダルベッコのリン酸緩衝生理食塩液(Mg, Ca含有)を添加し、窒素ガス置換後、2分間ボルテックスミキサーにより攪拌して、所望の遺伝子を含有するプラスミド包埋カチオニックMLV懸濁液を得ることができる。

上記で得られたプラスミド包埋カチオニックMLVを遺伝子治療剤として使用する一例としては、例えば発現目的遺伝子のcDNAを組み込んだ発現プラスミドを上記カチオニックMLVにDNA量として0.6 μ g、リポソーム脂質量として30nmolになるように包埋し、これを2 μ lのリン酸緩衝生理食塩液に懸濁させて患者より抽出した標的細胞または患者組織に対して隔日投与する方法が例示できる。

遺伝子治療とは、「疾病の治療を目的として、遺伝子または遺伝子を導入した細胞をヒトの体内に投与すること」と厚生省ガイドラインに定義されている。

本発明における遺伝子治療とは、該ガイドラインの定義を含め、更に前記した標的細胞または癌を始めとする各種疾患に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの

導入による治療や、標識となる遺伝子または標識となる遺伝子を導入した細胞をヒト体内に入れることも含むものとする。

本発明遺伝子治療に従う、所望遺伝子の標的細胞または標的組織への導入方法には、前記したように代表的には2種の方法が含まれる。その第1法は、治療対象とする患者細胞を採取した後、体外で例えばインターロイキン-2 (IL-2) などの添加により培養し、レトロウイルスベクターに含まれる目的とする遺伝子を導入した後、得られる細胞を再移植する手法(ex vivo法)である。該方法はADA欠損症を始め、欠陥遺伝子によって発生する遺伝子病や癌、AIDSなどの治療に好適である。第2法としては、目的遺伝子を直接患者の体内や腫瘍組織などの標的部位に注入する遺伝子直接導入法(直接法)が挙げられる。

上記遺伝子治療の第1法は、より詳しくは例えば次の如くして実施される。即ち、単核細胞を血液分離装置を用いて単球から分取し、分取細胞をIL-2の存在下にAIM-V培地などの適当な培地で72時間培養し、導入すべき遺伝子を含有するベクターを加える。遺伝子の導入効率をあげるために、プロタミン存在下に32℃で1時間、2500回転にて遠心分離した後、37℃で10

%炭酸ガス条件下で24時間培養する。この操作を数回繰り返した後、更にIL-2存在下にAIM-V培地などで48時間培養し、細胞を生理食塩水で洗浄し、生細胞数を算定し、遺伝子導入効率を前記in situ PCRや、
5 例えば所望の対象が酵素活性であればその活性の程度を測定することにより、目的遺伝子導入効果を確認する。
また、培養細胞中の細菌・真菌培養、マイコプラズマの感染の有無、エンドトキシンの検索などの安全度のチェックを行い、安全性を確認した後、予測される効果容量
10 の遺伝子導入された目的遺伝子を含有する培養細胞を患者に点滴静注により戻す。かかる方法を例えば数週間から数カ月間隔で繰り返すことにより遺伝子治療が施される。

ここでウイルスベクターの投与量は、導入する標的細胞
15 により適宜選択される。通常、ウイルス価として、例えば標的細胞 1×10^8 細胞に対して 1.0×10^3 cfuから 1.0×10^8 cfuの範囲となる投与量の採用が好ましい。

上記第1法の別法としては、目的遺伝子を含有するレ
20 トロウイルスベクターを含有するウイルス産生細胞と例えば患者の細胞とを共培養して、目的とする細胞へ遺伝子を導入する方法を採用することもできる。

本発明遺伝子治療の第2法(直接法)の実施に当たっては、特に体外における予備実験によって、導入遺伝子による目的遺伝子の導入がなされるか否かを予めベクター遺伝子cDNAのPCR法による検索やin situPCR法
5 による確認或は目的遺伝子導入による所望の治療効果である特異的活性の上昇や標的細胞の増殖増加や増殖抑制などの遺伝子導入効果の確認を行うことが望ましい。また、ウイルスベクターを用いる場合は、増殖性レトロウイルスなどの検索をPCR法で行うか、逆転写酵素活性
10 を測定するか、或は膜蛋白質(env)遺伝子をPCR法でモニターするなどにより、遺伝子治療に際して遺伝子導入による安全性を確認することが重要であることはいうまでもないことである。

悪性腫瘍を対象として、本発明遺伝子治療法を実施する一例としては、例えば患者から癌細胞を摂取後、酵素
15 処理などを施して培養細胞を樹立した後、例えばレトロウイルスにて所望の遺伝子を標的とする癌細胞に導入し、G418処理にて選択にかけた後、IL-12などの発現量を測定(in vivo)した後、放射線処理を施行し、患者
20 腫瘍内または傍腫瘍に接種する方法を例示することができる。

癌治療に限らず、本発明遺伝子導入用ベクターに使用

されるプロモーターとしては、各組織に固有のものを好ましく利用できる。その具体例としては、例えば、肝臓に対しては、アルブミン、 α -フェトプロテイン、 α_1 -アンチトリプシン、トランスフェリン、トランススチレンなどを例示できる。結腸に対しては、カルボン酸アンヒドラーゼ I、カルシノエμβロゲンの抗原などを例示できる。子宮及び胎盤に対しては、エストロゲン、アロマターゼサイトクローム P 4 5 0、コレステロール側鎖切断 P 4 5 0、17アルファ-ヒドロキシラーゼ P 4 5 0 などを例示できる。前立腺に対しては、前立腺抗原、g p 9 1-フォックス遺伝子、前立腺特異的カリクレインなどを例示できる。乳房に対しては、e r b-B 2、e r b-B 3、 β -カゼイン、 β -ラクトグロビン、乳漿蛋白質などを例示できる。肺に対しては、活性剤蛋白質 C ウログロブリンなどを例示できる。皮膚に対しては、K-14-ケラチン、ヒトケラチン 1 又は 6、ロイクリンなどを例示できる。脳に対しては、神経膠繊維質酸性蛋白質、成熟アストロサイト特異蛋白質、ミエリン、チロシンヒドロキシラーゼ 膀胱 ヴィリン、グルカゴン、ランゲルハンス島アミロイドポリペプチドなどを例示できる。甲状腺に対しては、チログロブリン、カルシトニンなどを例示できる。骨に対しては、 α 1 コラーゲン、オ

ステオカルシン、骨シアログリコプロテインなどを例示できる。腎臓に対してはレニン、肝臓／骨／腎臓アルカリ性ホスファターゼ、エリスロポエチンなどを、脾臓に対しては、アミラーゼ、PAP1などを例示できる。

- 5 ヘルペス単体ウイルスーチミジンキナーゼ（HSV-TK）遺伝子は、特にヌクレオチドアナログであるガンシクロビル（GCV）を毒性中間体に転換して、分裂性細胞の死をもたらすことが報告され、該遺伝子を腫瘍に対して用いる遺伝子治療が知られている〔米国特許第
- 10 5631236号明細書；特表平9-504784号公報参照〕。該方法は自殺遺伝子といわれる前記HSV-TK遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター産生細胞を注入して1週間後に抗ウイルス剤として知られているGCVを投与すると、遺伝子導入細胞ではGCVがリ
- 15 ン酸化を受けて活性化されて遺伝子導入細胞を自殺に導くと同時に、ギャップ・ジャンクションを介した細胞接触により、周囲の非導入細胞にも細胞死をもたらすことを利用した遺伝子治療法である。

- 上記においては、GCVの投与に代えて、本発明
- 20 pancpin遺伝子導入用ベクターを投与する遺伝子治療の併用療法が実施可能である。

別の遺伝子治療法としては、標的細胞表面に結合する

抗体を結合させた本発明pancpin遺伝子導入用ベクター含有イムノリポゾームを作製し、包埋したcDNAを選択的に効率よく標的細胞に導入させる方法があげられる。また、前記したサイトカイン遺伝子含有ウイルスベクターと自殺遺伝子含有アデノウイルスとを同時に投与する結合遺伝子療法も可能である。これらの方法は当該分野における当業者の技術でレベルある。

本発明の範囲にはまた、本発明遺伝子導入用ベクター又は目的遺伝子が導入された細胞の薬学的有効量を、適当な医薬担体乃至希釈剤と共に含む医薬組成物乃至医薬製剤（遺伝子治療剤）が含まれる。

上記医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤乃至賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

本発明医薬製剤の投与単位形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤などの固体投与形態及び溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、エリキシルなどの液剤投与形態が含まれる。これらは更

に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（経管的或は注射剤）、経鼻剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、軟膏剤などに分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形乃至調製することができる。

- 5 例えば、本発明遺伝子導入用ベクターを含む医薬製剤は、該ベクターをリポソームに包埋された形態或は所望の遺伝子が包含されるレトロウイルスベクターを含むウイルスによって感染された培養細胞の形態に調製される。これらは、リン酸緩衝生理食塩液(pH7.4)、リンゲル液、
- 10 細胞内組成液用注射剤中に含有される形態などに調製することもでき、また前記形態にプロタミンなどの遺伝子導入効率を高める物質と共に投与される形態に調製することもできる。

- 本発明製剤を錠剤形態に成形するに際しては、製剤担
- 15 体として例えば通常使用される賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、崩壊抑制剤、吸収促進剤、保湿剤、吸着剤、滑沢剤などを使用できる。

- カプセル剤は、常法に従い通常本発明有効成分を常套される各種の製剤担体と混合して硬質ゼラチンカプセル、
- 20 軟質カプセルなどに充填して調製される。

経口投与用液体投与形態は、慣用される不活性希釈剤、例えば水を含む医薬的に許容される溶液などを包含し、

これらには更に湿潤剤、乳剤、懸濁剤などの助剤を含ませることができる。これらは常法に従い調製される。

- 5 非経口投与用の液体投与形態、例えば滅菌水性乃至非水性溶液、エマルジョン、懸濁液などへの調製に際しては、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エトキシ化
- 10 イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル及びオリーブ油などの植物油などを使用できる。
- 15 また注入可能な有機エステル類、例えばオレイン酸エチルなどを配合できる。これらには更に通常の溶解補助剤、緩衝剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、分散剤などを添加することもできる。滅菌は、例えばバクテリア保留フィルターを通過させる濾過操作、殺菌剤の配合、照
- 20 射処理及び加熱処理などにより実施できる。また、これらは使用直前に滅菌水や適当な滅菌可能媒体に溶解することのできる滅菌固体組成物形態に調製することもできる。

- 坐剤や膣投与用製剤形態に成形するに際しては、製剤
- 20 担体として、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン及び半合成グリセライドなどを使用できる。

ペースト、クリーム、ゲルなどの軟膏剤形態への成形に際しては、希釈剤として、例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト及びオリーブ油などの植物油などを使用できる。

経鼻又は舌下投与用組成物は、周知の標準賦形剤を用いて、常法に従い調製することができる。

尚、本発明薬剤中には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などや他の医薬品などを含有させることもできる。

上記医薬剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤は経口投与され、注射剤は単独で又はブドウ糖やアミノ酸などの通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で直接的、経管的腫瘍内、筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与され、坐剤は直腸内投与され、経膣剤は膣内投与され、経鼻剤は鼻腔内投与され、舌下剤は口腔内投与され、軟膏剤は経皮的に局所投与される。

上記医薬剤中に含有されるべき本発明有効成分の量及びその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、

投与法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。一般には、医薬製剤としての所望遺伝子含有レトロウイルスベクターの投与量は、1日当り成人体重1kg当り、例えばレトロウイルスの力価として約 1×10^3 pfuから 1×10^{15} pfu程度とするのがよい。また所望の導入用遺伝子が導入された細胞の場合は、 1×10^4 細胞/体から 1×10^{15} 細胞/体程度の範囲から選ばれるのが適当である。

該製剤は1日に1～数回に分けて投与することもでき、1から数週間間隔で間欠的に投与することもできる。尚、好ましくは、プロタミンなど遺伝子導入効率を高める物質又はこれを含む製剤と併用投与することができる。

本発明に従う遺伝子治療を癌の治療に適用する場合は、前記した種々の遺伝子治療を適宜組合わせて行う（結合遺伝子治療）こともでき、前記した遺伝子治療に、従来の癌化学療法、放射線療法、免疫療法などを組合わせて行うこともできる。さらに本発明遺伝子治療は、その安全性を含めて、NIHのガイドラインを参考にして実施することができる〔Recombinant DNA Advisory Committee, Human Gene Therapy, 4, 365-389 (1993)〕。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1の(1-2)に従う増幅されたcDNA断

片のサブ・クローニングにおける異なる m R N A 表出結果及び実施例 1 の(2)に従うノーザンブロット分析により調べた本発明遺伝子のヒト組織における分布、をそれぞれ示す写真である。

- 5 図 2 は、本発明 pancpin 遺伝子の発現蛋白質と公知の蛋白質とのアミノ酸配列における相同性を比較した図である。

図 3 は、本発明遺伝子の染色体上の位置を調べた結果を示す写真である。

- 10 図 4 は、実施例 1 の(4)に従う、3 種のノーマル (Normal)、4 種の細胞株 (Cell line) 及び 13 種の膵臓癌組織 (Pancreatic tumor) を R T - P C R 分析した結果を示す写真であり、上段は pancpin の結果を、下段はコントロールとしての β - 2 - ミクログロブリンの結果
- 15 を示す。

図 5 は、実施例 1 の(5)に従う膵臓癌における pancpin 遺伝子の変異を分析した結果を示す写真である。

図 6 は、実施例 2 に従う本発明遺伝子導入用ベクター構築の概略図である。

- 20 図 7 は、R T - P C R による T S A 2 0 0 4 の発現を示す写真である。

図 8 は、T S A 2 0 0 4 の細胞増殖に及ぼす影響につ

いて示した図面である。

図 9 は、実施例 3 で調製した組換え pancpin 蛋白質の SDS-PAGE の結果を示す写真である。

図 10 は、実施例 3 で得たモノクローナル抗体の特異
5 反応性を示す写真である。

図 11 は、上記モノクローナル抗体を用いて行なったヒト臍臓切片の免疫染色結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため、本発明
10 pancpin 遺伝子の調製例を実施例 1 に、本発明 pancpin 遺伝子導入用ベクター及びこれを保有する細胞の調製例を実施例 2 に、また本発明 pancpin 蛋白質に特異結合性を有するモノクローナル抗体の調製例を実施例 3 に、それぞれ示す。本発明の範囲はこれら実施例に限定されるもの
15 ではない。

実施例 1

(1-1) [α - 32 P] CTP を用いたディファレンシャル
ディスプレイ法による組織特異的遺伝子の単離
組織特異的に発現するヒト遺伝子を単離するために、
20 [α - 32 P] CTP で標識したディファレンシャル ディ
スプレイ法を用いた。該方法の手順は本質的に以下に示
すリアングの方法 [Liang P., et al., Science, 257,

967-971 (1992)) によって行なった。

即ち、13のヒト組織（成人脳、胎児脳、肺、肝臓、胃、脾臓、脾臓、乳腺、前立腺、胎盤、精巣、腎臓及び心臓：クローンテック社製）の各々から単離したポリA
5 RNA（0.2 μ g）を、ジエチルピロカーボネート処理された水の8 μ l中で、3'-アンカード・オリゴdTプライマー5'-GT₁₅MA（MはG、A及びCの混合液である）の25 pmolと混合し、65℃で5分間加熱した。この溶液に4 μ lの5×ファースト・ストランド緩
10 衝液（BRL社製）、2 μ lの0.1 M DTT（BRL社製）、1 μ lの250 mM dNTPs（BRL社製）、1 μ lのリボヌクレアーゼ・インヒビター（40単位；TOYOBO社製）及び1 μ lのスーパースク립トII逆転写酵素（200単位；BRL社製）を加えた。各反
15 応液の最終容量は20 μ lであった。各溶液を37℃で1時間インキュベートした後、30 μ lの蒸留水の付加により2.5倍に希釈し、使用時まで-20℃で貯蔵した。

cDNAは、[α -³²P]CTPで標識した（アマシャム社製）3'-アンカード・プライマーの存在下で
20 PCRによって増幅した。このcDNAのPCR増幅は、以下のとおり実施された。即ち、各20 μ lのPCR混

合液は、 $2\mu\text{l}$ のRT反応混合液、 $2\mu\text{l}$ の $10\times$ PCR緩衝液（タカラ社製）、 $4\mu\text{l}$ の 2.5mM dNTPs、 $0.25\mu\text{l}$ のEx Taq DNAポリメラーゼ（5単位/ ml ：タカラ社製）、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ で標識した 25pmol の3'-アンカード・オリゴ-dT プライマー及び 25pmol の5'-プライマー（No. 20、5'-GATCTGACAC-3'の任意配列を有する10-merデオキシオリゴヌクレオチド・プライマー）を含んでいた。また、PCR反応は以下の条件で行った。

10 即ち、 95°C で3分間、 40°C で5分間及び 72°C で5分間を1サイクルとして行い、それから 95°C で0.5分間、 40°C で2分間及び 72°C で1分間を40サイクル行い、最後に 72°C で5分間反応させた。

PCR反応サンプルをエタノールで抽出し、フォルム

15 アミド・シーケンシングダイ中に再懸濁して、6%アクリルアミド、7.5Mウレア・シーケンシング・ゲルを用いて電気泳動させた。ゲルは固定することなしに乾燥させ、一晩オートラジオグラフィーを実施した。

(1-2) 増幅されたcDNA断片のサブ・クローニング

20 予め乾燥ゲルを載せた3MM濾紙上にラジオアクティブインクで印を付けておき、これとオートラジオグラムをあわせることにより、目的のcDNAを含むバンドが

含まれるゲルを、3 M M 濾紙ごと切り出した後、300
 μ l の d H₂O にて1時間攪拌した。ポリアクリルアミド
・ゲルと濾紙を取り除いた後、c D N A をテンプレート
として、1 μ l の 10 m g / m l グリコーゲンと 0. 3
5 M N a O A c の存在下、エタノール沈澱によって再回収
し、10 μ l の d H₂O に再溶解した。再増幅のために5
 μ l のこの溶液を用いた。P C R の条件とプライマーは
最初の P C R に対してと同じとした。適当な大きさの再
増幅産物を第一の P C R 産物として再回収し、それから
10 その P C R 産物を p U C 1 1 8 ベクター(タカラ社製)の
Hinc II 部位にクローンニングした。核酸配列は A B I
3 7 7 自動シーケンサー(アプライド・バイオ・シス
テムズ社製)によって決定した。

上記方法にて、胎児脳 (F. brain)、成人脳 (A.
15 brain)、肺 (Lung)、肝臓 (Liver)、胃 (Stomach)、
膵臓 (Pancreas)、精巣 (Testis)、前立腺 (Prostate)、
脾臓 (Spleen)、乳腺 (Breast)、胎盤 (Placenta)、
心臓 (Heart) 及び腎臓 (Kidney) から単離した m R N A
を使用する、ディスプレイの結果を図 1 の上段 (a と表
20 示) に示す。

該図より、1つのプライマーの組合せで P C R 増幅を
行い、膵臓に特異的に発現した一つの P C R 産物を確認

した。

クローニングされ、配列決定されたこのPCR産物を TSA 2004 と命名した。この産物は、235ヌクレオチドからなっていた。FASTAプログラム

- 5 (Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 2444-2448 (1988))を用いてGenBank/EMBLデータベース中のDNA配列とこのヌクレオチド・データとの比較より、このPCR産物が他の如何なる公知のDNA配列と相同性がないことが明らかとなった。

10 (1-3) フルレングス cDNA のスクリーニング

- ヒト正常脾臓 cDNA ライブラリーは、オリゴ (dT) -プライムド・ヒト正常脾臓 cDNA と Uni-ZAPTMXR (ストラタジーン社製)を用いて構築した。 1×10^6 個のファージクローンより、 $[\alpha - ^{32}\text{P}] - \text{dCTP}$ にて標識された cDNA 断片をプローブとして用いてそのスクリーニングを行なった。陽性クローンを選択し、それらの挿入 cDNA 部分をインビボイクシジョン (in vivo excision) 法により、pBluescript II SK(-)にサブクローニングした。

- 20 その結果、本発明者らは、TSA 2004 に対して約 200 の陽性プラークを確認した。この結果より、全 RNA 間の転写量は、およそ 0.02% であると計算され

た。T S A 2 0 0 4 (pancpin) のフルレンジ s c D N A
配列は、計算された分子量 4 6 1 7 9 Da を有する 4 0 5
アミノ酸の蛋白質をコードする 1 2 1 5 ヌクレオチドの
オープン・リーディング・フレームを含む 1 4 6 5 ヌク
5 レオチドを含んでいた。

推定された pancpin 蛋白質配列は、アミノ末端近くに局
在している、分泌を促進するとされるシグナル配列を含
んでいた。pancpin 蛋白質は、3 つのシステイン残基
(Cys21、Cys126 及び Cys265) と 3 つの潜在的な N-グリコ
10 シレーション部位 (Asn202、Asn207 及び Asn306) を含んで
いた。

更に F A S T A プログラムを用いた公共のデータベース
中の公知の蛋白質との比較を行なった結果は、図 2 に示
す通りである。

15 図 2 は、各蛋白質のアミノ酸を一文字表記して、その
配列を比較したものであり、図中、同一アミノ酸は反転
表示してある。

該図より、pancpin 蛋白質は、プラズミノゲン・アク
チベーター・インヒビター-2 (P A I - 2) [Ye R.
20 D., et al., J. Biol. Chem., 262, 3718-3725 (1987)]、
鱗状細胞癌抗原 (S C C A - 1) [Schneider S. S., et
al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92, 3147-3151

(1995))、単球／好中球エラスターゼ・インヒビター (E I) [Remold-O'Donnel, E., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 5635-5639 (1992)] 及びマスピン (M a s p i n) [Zou Z., et al., Science, 263, 526-529 (1994)] とそれぞれ、33%、35%、36%及び30% 同一であり、有意な相同性が確認された。このことは、pancpin蛋白質がセルピン・ファミリー (オボアルブミン・ファミリー) の新しいメンバーであることを示している。

10 (2) 組織における発現

組織における pancpin の発現プロファイルを調べるため、各種のヒト組織を用いたノーザンブロット分析を行った。

ノーザン・ブロット分析には、ヒト M T N (Multiple-Tissue Northern) ブロット I と II (クローンテック社製) を使用した。c D N A 断片は、T 3 と T 7 プロモーター配列のプライマー・セットを用い、P C R によって [α - 32 P] - d C T P で標識した。増幅産物を含むメンブランをプレハイブリダイズ (条件は製品のプロトコールに従った) し、そしてそれから製品のプロトコールに従い、ハイブリダイゼーションを行なった。

ハイブリダイゼーション後、洗浄した膜を - 8 0 ° C で 4 8 時間露光した。その結果は図 1 の下段 (b と表示)

に示すとおりである。

該図において、用いたヒト組織は、心臓 (Heart)、脳 (Brain)、胎盤 (Placenta)、肺 (Lung)、肝臓 (Liver)、骨格筋 (Sk. muscle)、腎臓 (Kidney)、脾臓 (Pancreas)、脾臓 (Spleen)、胸腺 (Thymus)、前立腺 (Prostate)、精巣 (Testis)、卵巣 (Ovary)、小腸 (Small int.) 及び大腸 (Colon) である。

該図より、pancpinに相同する約 1.3 kb 転写体が脾臓において、特異的に観察された。この結果は、ディフ
10 ァレンシャル ディスプレイ法において見られる発現パターン (図 1 の上段 a 参照) と一致していた。

(3) F I S H

染色体上の位置を決定するための F I S H を、公知の方法 [Takahashi E., et al., Hum. Genet., 86, 14-16
15 (1990)] に従って、各コスミド DNA の 0.5 μ g をプローブとして実施した。F I S H はプロビア 100 フィルム (フジ社製、I S O 100) 又は C C D カメラ・システム (アプライド・イメージング、サイトビジョン社製) によって解析された。

20 その結果は、図 3 に示す通りであり、100 の典型的な R-バンド (前) 分裂中期の細胞においてシグナルは、染色体 3 のバンド q 26.1 - q 26.2 に局在してい

た。従って、pancpin遺伝子の染色体局在部位は、3 q 26. 1 - q 26. 2 と同定できた。

(4) R T - P C R 法による膵臓癌細胞株と膵臓癌組織
における転写物の発現様式

- 5 pancpin遺伝子の発現がヒト膵臓癌細胞株と膵臓癌組織
において異なるかどうかを調べるために、4つの細胞株
(B x P C - 3 (腺癌・未分化, Cancer Invest., 4,
15-23 (1986)), A S P C - 1 (転移性腺癌, J. Natl.
Cancer Inst., 67, 563-569 (1981)), P A N C - 1
10 (類上皮性、膵管癌, Int. J. Cancer, 15, 741-747
(1975)) 及び M I A P a C a - 2 (腺癌, Int. J.
Cancer, 19, 128-135 (1977)) と 13 の膵臓の癌組織
(東京大学医科研究所、中村先生より供与) の R T - P
C R 分析を行なった。
- 15 即ち、全 R N A を I S O G E N (和光社製) を使用し
て細胞株と膵臓癌組織から単離した。10 μ l の全
R N A を 10 単位の R N a s e フリー D N a s e I (ベ
ーリンガー・マインハイム社製) で 15 分間処理し、フ
ェノール・クロロフォルムで 2 回抽出し、エタノールで
20 沈澱させた。一本鎖 c D N A をオリゴ d (T) とランダム
プライマーを使用して Superscript IITM 逆転写酵素
(ライフ・テクノロジー社製) によって合成した。

P C R 増幅のために $2 \mu\text{l}$ の各産物を用いた。

配列表に配列番号：4 及び配列番号：5 として示した塩基配列のプライマー P 1 及び P 2 を、自動オリゴヌクレオチド合成機を用いて合成し、これらを 25 サイクルの P C R 増幅のために使用した。

尚、P C R 反応は 100 ng DNA 、 $1 \mu\text{M}$ 各プライマー、 2.5 mM dNTP 及び 0.25 U の E x T a q D N A ポリメラーゼ（タカラ社製）を含む $5 \mu\text{l}$ 溶液中で行なった。P C R 産物は 1.5% アガロースゲルにより分離した。

上記に従い、3 種のノーマル（Normal、レーン 1、2 及び 3）、4 種の細胞株（Cell line、レーン 4 = B x P C - 3, レーン 5 = A S P C - 1, レーン 6 = P A N C - 1, レーン 7 = M I A P a G a - 2）及び 13 種の膵臓癌組織（Pancreatic tumor、レーン 8 ~ 20）を R T - P C R 分析した結果は、図 4 に示す通りである。尚、図の上段は pancpin の結果を、下段はコントロールとしての β - 2 - ミクログロブリン（ β - 2 - microglobulin）の結果を示す。

該図より、pancpin の発現は、全ての細胞株とほとんどの癌組織において見当たらないことが判った。

(5) 膵臓癌における pancpin 遺伝子の変異分析

癌抑制因子としてのpancpinを更に調べるために、16の膵臓癌組織からのDNAをPCR-SSCPにより、pancpin遺伝子(エクソン1、2、3及び4)の変異をスクリーニングした。

- 5 SSCP [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 86, 2766-2770 (1989)] 分析は、コーディング領域に相同する各エクソン(エクソン2、3及び4)のPCR増幅によって実施した。

- 使用したPCRプライマーは、各エクソンを増幅する
10 ためにイントロン内にデザインした配列を有するものであり、その塩基配列は、エクソン1用が配列番号：6及び：7に、エクソン2用が配列番号：8及び：9に、エクソン3用が配列番号：10及び：11に、またエクソン4用が配列番号：12及び：13に、それぞれ示されている。
15 これらの各プライマーは、自動オリゴヌクレオチド合成装置を用いて合成した。

- PCR反応は、100 ng DNA、1 μ M各プライマー、25 μ M dNTP、2 μ Ci (α - 32 P)-dCTP (アマシャム社製) 及び0.25 U Ex Taq DNA
20 ポリメラーゼを含む5 μ l溶液中で行なった。

SSCP分析によって示されたバンドのPCR産物は、TAクローニング・ベクター(ノバゲン社製)にサブク

ローニングし、10クロンをABI 377自動シーケンサーによって配列決定した。

その結果は図5（エクソン3についての結果のみ示す）に示されるとおりである。試験した16の膵臓癌組織由来のDNA（表中、それぞれレーン21～36と表示）のSSCP分析の結果、エクソン3のPCR産物は、野生型パターン（レーン21～24、26～29及び31～36）に加えて、変異した可能性を持つバンドを示すパターンが認められた（レーン25及び30参照）。

上記2つの変異した可能性のあるバンドを示すPCR産物につき、これをTAクローニングベクター（ノバゲン社製）にサブクローニングし、それぞれ10クロンずつシーケンシングした。

その結果、221番目のコドンのAがGに変化するポイント変異を起こし、この位置でアルギニンがグリシンに置換されることが明らかとなった。この変異は40の正常ヒトDNAsにおいては認められなかった。即ち、この変異は体細胞変異であることが示唆された。このことから、癌患者のDNA中には異常なpancpinが存在することが判る。

実施例 2

(1) pancpin (TSA-2004) 遺伝子導入用ベクター

の構築

この例では、T S A 2 0 0 4 の全長をコードする遺伝子を p c D N A 3. 1 ベクター (Invitrogen社製) に組み込んで、本発明に係る pancpin 遺伝子導入用ベクターを、
5 以下の通り構築した。その構築の概略は、図 6 に示す通りである。

尚、本例で用いた p c D N A 3. 1 ベクターは、サイトメガロウイルスのプロモーターを有し、薬剤耐性遺伝子としてのネオマイシン耐性遺伝子及びアンピシリン耐
10 性遺伝子を有する 5. 5 kb のベクターであり、該ベクターは制限酵素 Bam HI、Xho I、Sca I などの認識部位を有している。その特徴は上記図 6 に示すとおりである。

該図 6 において、P_{cmv} は、サイトメガロウイルス初期プロモータ/エンハンサーを示す。BGHpA は、ウシ胎児成長ホルモン (Bovine Growth Hormone) ポリアデニレ
15 ションシグナルを示す。f1 ori は、f1 ファージレプリケーションオリジンを示す。SV40 ori は、SV40 初期プロモーターとオリジンを示す。Neomycin は、ネオマイシン耐性遺伝子を示す。SV40 pA は、SV40 ポリアデニレ
20 ションシグナルを示す。ColE1 は、大腸菌中での多コピー数のレプリケーションオリジンを示す。Ampicilin は、アンピシリン耐性遺伝子を示す。

また、T7は、T7プロモーター／プライミングサイトを
示す。ATGは、開始コドン（メチオニン）を示す。

(HIS)₆は、エピトープタグ（ヒスチジンの6回繰り返し）
を示す。Anti-Xpress epitopeは、エピトープタグ（Asp
5 -Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys）を示す。

EK siteは、エンテロキナーゼ切断部位を示す。Asp718I、
KpnI、Bam HI、Xho I、Xba I及びApa Iは、それぞれ制限
酵素を示す。

即ち、まずT S A 2 0 0 4 遺伝子のD N A 配列情報を
10 基に、配列番号：1 4 及び配列番号：1 5 に示される塩
基配列を有する2つのプライマーA及びBを、自動オリ
ゴヌクレオチド合成装置を用いて合成し、これらを増幅
プライマーとして用い、T S A 2 0 0 4 の全長1 2 1 5
ヌクレオチドのO R F 領域（図中、「T S A 2 0 0 4 g
15 ene (1218bp)」と表示、これは更に終止コドンを含む、
その塩基配列は配列番号：3 に示す）を、以下の通り、
サブクローニングした。尚、上記Aプライマーは、Bam
HIサイト（G G A T C C）を、またBプライマーはXho
Iサイト（C T C G A G）を含んでいる。

20 即ち、上記各プライマーを用いて、ヒト正常膵臓由来
のc D N A（pancreas marathon ready c D N A：クロー
ンテック社製）を用いてP C Rを行い、c D N Aを増幅

させて、およそ1200塩基長の産物を得、制限酵素処理及び精製した（このものは図6中「Bam HI-Xho I断片」として示される）。

このものを、pcDNA3.1ベクターに挿入し、クローニングして、所望の発現ベクターを得た（図中「pcDNA3.1/HisA,B,C」と表示、5.5kb）。得られたベクターの全塩基配列を決定し、これが全長のTSA2004遺伝子の塩基配列を有することを確認した。

(2) pancpin (TSA-2004) 遺伝子導入細胞の作製

上記(1)で得られた発現ベクターをカチオニック・リポソームを用いて膵臓癌細胞株PANC-1（類上皮性膵管癌：Int. J. Cancer, 15, 741-747 (1975)）にトランスフェクトした。

該方法は、完全長の本遺伝子を含むpcDNA3.1ベクターのアンピシリン耐性遺伝子配列部位を一カ所、Sca Iで切断してリニアなDNAとし、カチオニック・リポソームのセル・フェクチン（Cell FECTINTM Reagent; GIBCO-BRL社製：TM-TPS (N, N', N'', N'''-tetramethyl-N, N', N'', N'''-tetrapalmityl spermine: DOP E (dioleoyl phosphatidylethanol amine) をモル比1 : 1.5の割合で含むリポソーム)の存在下で、トランスフェクトした。

p c D N A 3. 1 ベクターは、遺伝子が導入された細胞に対して、ネオマイシン耐性を獲得するように設計されているために、ネオマイシン処理によりスクリーニングすることによって、T S A 2 0 0 4 を発現する安定な形質転換体 8 株を得た。また、なにも挿入していない空のベクターをトランスフェクトして得られた安定な形質転換体 2 株を得た。

(3) T S A 2 0 0 4 の蛋白質発現の細胞増殖への影響

T S A 2 0 0 4 無処置の P A N C - 1 細胞（図 7 中「Wild」と表示）、空のベクターの入った安定な形質転換体 2 株（図 7 中「Vector only」と表示）及び T S A 2 0 0 4 を発現する安定な形質転換体 8 株（図 7 中「TSA2004 Transformants」と表示）のそれぞれについて、これらの細胞増殖能を調べた。

尚、T S A 2 0 0 4 遺伝子の発現は、配列表に、配列番号：16 及び：17 として示した、T S A 2 0 0 4 遺伝子の一部の塩基配列に相当する塩基配列を有する合成プライマー（C 及び D）を用いた R T - P C R にて確認した。合成プライマー C は、T S A 2 0 0 4 遺伝子の 221 - 240 b p に相当する塩基配列を有しており、また合成プライマー D は同 T S A 2 0 0 4 遺伝子の 611 - 631 b p に相当する塩基配列を有している。

その結果は、図 7 に示す通りである。

図 7 は、R T - P C R 産物を電気泳動した結果を示す写真であり、Markerとしては ϕ X174 Hae IIIを用いた。

該図 7 より、T S A 2 0 0 4 の安定な形質転換体には、
5 4 0 0 塩基程度の P C R 産物が認められたが、空ベクターおよび無処置の P A N C - 1 細胞には認められないことが明らかである。

また上記各細胞を、24 穴プレート上に 10^4 個 / ウェルになるようにまき、D - M E M + 1 % F C S の条件下
10 で培養を行い、1 - 5 日における生細胞数を、トリパンブルー染色法にて測定した。

その結果を図 8 に示す。図中、縦軸は、P A N C - 1 細胞数 ($\times 10^4 / \text{ml}$) を、横軸は、培養日数 (Day) を示す。

15 図 8 に示す通り、T S A 2 0 0 4 遺伝子の安定な形質転換体 (図中、「TSA2004 Transformants」と表示) は、無処置 (図中「Wild」と表示) 及び空ベクターの安定な形質転換体 (図中「Vector only」と表示) と比べて、著しく増殖が抑えられていることが明らかになった。

20 このことは、T S A 2 0 0 4 蛋白質が細胞内で機能することにより細胞の増殖能を負に制御していることを強く示唆している。従って、本発明の T S A 2 0 0 4 遺伝

子（pancpin遺伝子）を含有する遺伝子導入用ベクターの利用、即ち該ベクターを細胞に導入して遺伝子を発現させる時には、癌細胞の増殖が抑制され、これが癌治療に有用であることが判る。

5 実施例 3

(1) pancpin蛋白質発現ベクターの構築

本発明pancpin遺伝子のコード領域の一部をサブクロニングして免疫原を得るために、本発明pancpin遺伝子のDNA配列情報（配列番号：3）を基に、配列番号：

10 18及び：19に示す配列のプライマーA及びBを自動オリゴヌクレオチド合成装置を用いて合成した。

尚、プライマーAは、ECoR 1サイト（GAATTC）を、プライマーBは、Xho 1サイト（CTCGAG）を含んでいる。

両プライマーを利用し、ヒト正常膵臓由来のcDNA
15 （pancreasmarathon ready cDNA：CLONTECH社製）を用いてPCRを行い、cDNAを増幅し、およそ860塩基の産物（pancpin蛋白質の120－406アミノ酸をコードするDNA配列を有する）を得た。

増幅させたcDNAをエタノール沈殿した後、

20 PGEX-4T-1（Amersham pharmacia biototech社製）に挿入し、クローニングし、この全配列を確認した。

(2) 組換え蛋白質の発現並びに精製

上記で得られた pancpin 蛋白質の部分配列 (120-406) をコードする塩基配列を含む P G E X - 4 T - 1 を、大腸菌 J M 1 0 9 にトランスフォームし、イソプロピル β - D - チオガラクトシド (IPTG, Isopropyl β - D - Thiogalactoside、終濃度 2 m M) を用いて蛋白質の発現を誘導した。

グルタチオン S - トランスフェラーゼ (Glutathione S-Transferase, GST) 融合蛋白質として発現された菌体内の目的蛋白質を、緩衝液 (20mM Tris/HCl pH7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10% ショ糖) 下にて超音波破碎によって溶出させ、グルタチオンセファロース 4 B (Glutathione Sepharose 4B, Amersham pharmacia biotetech 社製) ビーズを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。

ビーズを洗浄後、2 0 m M 還元型グルタチオン (glutathione) 溶液を用いて、ビーズから目的蛋白質を溶出させ、S D S - P A G E によって確認した。

結果を図 9 に示す。

図 9 中、レーン 1 は、分子量マーカー (分子量 : 6 6 4 0 0, 5 5 6 0 0, 4 5 0 0 0, 3 5 7 0 0) であり、レーン 2 には精製された目的蛋白質 (pancpin 蛋白質 (120-406)) を示している。

(3) 組換え蛋白質による免疫及びモノクローナル抗体の樹立

上記で精製した目的蛋白質を、完全フロインドアジュバント(DIFCO LABORATORIES)と混合してエマルジョンを作成し、これを一匹あたり $5 \mu\text{g}$ となる蛋白質量にて、
5 BALB/c マウス(雌性、6-8 週齢、25-30 g)に皮下注射して免疫した。

2 週間間隔で 5 回の免疫の後、脾臓細胞を採取し、マウスミエローマ細胞 P 3 U 1 と、PEG 法により細胞融合した。
10

抗体産生細胞のスクリーニングは、96 ウェルのプレートを用いた ELISA 法によって行った。

上記で用いた免疫原には、タグとして GST が付加されているので、該タグに対する抗体を陽性と判定しない
15 ように、GST を用いた ELISA も同時に行った。

以上のスクリーニングの結果、目的蛋白質 pancpin (120-406) と特異的に反応する抗体産生クローンとして 3 つのハイブリドーマを樹立した。

その内の一つを「G-HOT 1」と命名した。このハイブリドーマは、1998 年 8 月 21 日に、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 3 号(郵便番号 305-8566)の
20 通商産業省工業技術院生命工学工業研究所に、受託番号

F E R M B P - 6 4 6 9 として受託された。

上記で得られたハイブリドーマ G - H O T 1 より、所望のモノクローナル抗体を産生させ、精製した。即ち、ハイブリドーマ投与の 2 - 3 日前にプリスタン (2 , 6 ,
5 1 0 , 1 4 - テトラメチルペンタデカン、アルドリッチ社製) を接種しておいた B A L B / c 系マウスに、上記ハイブリドーマを 1×10^6 個 / 匹となる量で腹腔内投与した。投与 10 - 14 日後に、蓄積された腹水を採取、回収し、バイオラッド社のキット (B I O - R A D M A P S - I I K i t)
10 を用いて精製した。

かくして得られた精製抗体のサブクラスは、ストラタジーン社のキット (I s o D e t e c t I s o t y p i n g K i t , S T R A T A G E N E) を用いた検定の結果、 I g G₁であった。

(4) 抗体の評価

15 上記で調製した精製モノクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロッティング及び免疫染色を行った。

上記ウエスタンブロッティングの結果を図 10 に示す。

図 10 中、レーン 1 は、何もトランスフォームしていない対照の大腸菌のライセート (l y s a t e , 溶菌液) であり、レーン 2 は、目的 pancpin 蛋白質 (120-406) の発現ベクターをトランスフォームし、 I P T G で発現誘導を行った大腸菌のライセート (l y s a t e , 溶菌液) である。
20

該図のレーン 2 より、pancpin蛋白質(120-406)に相当するバンドが特異的に染色されていることが明らかである。このことから、G-HOT 1 由来のモノクローナル抗体は、免疫原として用いたpancpin蛋白質(120-406)と、
5 特異的に反応することがわかる。

また、免疫染色は次のとおり行なった。即ち、新鮮なヒト膵臓をホルマリン固定し、パラフィン切片を作成し、該切片を、ベクター社のキット (VECTASTAIN ABC Kit, Vector) を用いたアビシンービオチン化酵素複合体法
10 (ABC法)にて染色した。尚、一次抗体として、G-HOT 1 投与マウスの腹水をPBS (0.1%BSAを含む)にて500倍希釈して用いた。

ヒト膵臓切片の免疫染色結果を、図11に示す。

図11より、青く染まっている核の近傍に、黒く染まっているpancpin蛋白質が認められ、このことから、おも
15 に腺房細胞の核近傍の細胞質が強く染まっていることがわかった。

以上のように、本発明に係わるpancpin蛋白質に対するモノクローナル抗体は、pancpinを特異的に認識するものであることが判った。またこの抗体は以下のように免疫組織化学的に有効であるといえる。即ち、本発明抗体は、
20 正常膵臓にて発現し、癌においてその発現の消失が

m R N A レベルで証明されている pancpin の蛋白質レベルでの挙動を直接観察可能にするものであり、従って診断的にも、また発癌メカニズム解明にも有効である。

産業上の利用可能性

- 5 本発明によれば、膵臓の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有する、新規な pancpin 蛋白質、これをコードする遺伝子及び該蛋白質と特異反応性を有する抗体が提供され、これらは、膵臓癌などの癌や癌化の解明、その診断、予防及び治療などに有用である。
- 10 また本発明によれば、 pancpin 遺伝子を含有する遺伝子治療のための遺伝子導入用ベクター、該ベクターを保有する細胞、該ベクター又は細胞を有効成分とする遺伝子治療用組成物、その利用による遺伝子治療法、特に、膵臓癌などの癌の増殖抑制並びに転移抑制処置技術が提供
- 15 される。

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 及び (b) のいずれかの蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子：
 - (a) 配列番号：1 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、
 - (b) 配列番号：1 で示されるアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、脾臓の腫瘍形成、腫瘍進展及び転移を抑制する作用を有する蛋白質。
2. 塩基配列が、配列番号：3 で示されるものである請求項1に記載の遺伝子。
3. 以下の (a) 及び (b) のいずれかのポリヌクレオチドからなる遺伝子：
 - (a) 配列番号：2 で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド、
 - (b) 配列番号：2 で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。
4. ヒト遺伝子である請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子。
5. pancpin遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用される請求項3に記載の遺伝子の

D N A 断片。

6. 請求項 1 に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。

7. 請求項 6 に記載の蛋白質と結合性を有する抗体。

5 8. 請求項 7 に記載の抗体の産生能を有するハイブリドーマ。

9. F E R M B P - 6 4 6 9 として寄託された請求項 8 に記載のハイブリドーマ。

10 10. 配列番号：3 で示される塩基配列の全部又は一部を含む遺伝子を含む、遺伝子治療のための遺伝子導入用ベクター。

11. レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、H I V ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター及びエプスタインバーウイルスベクターから
15 選択されるものである請求項 10 に記載の遺伝子導入用ベクター。

12. 請求項 10 に記載の遺伝子導入用ベクターを保有する細胞。

20 13. 請求項 11 に記載の遺伝子導入用ベクターを保有する請求項 12 に記載の細胞。

14. 請求項 10 に記載の遺伝子導入用ベクターを、リ

- ン酸カルシウム共沈法、リボソームと不活性化センダイウイルスを融合させて膜融合リボソームに包埋させる膜融合リボソーム法、プラスミドDNAを金でコートして高圧放電によって物理的に細胞内にDNAを導入する方法、プラスミドDNAを直接インビボで臓器、腫瘍中に注入するネイキッドDNA法、多重膜正電荷リボソームに包埋した遺伝子を細胞に導入するカチオニックリボソーム法、及び目的とする細胞に発現するレセプターに結合するリガンドをDNAと結合させるリガンド-DNA複合体法から選ばれる遺伝子導入法によって導入してなる請求項12に記載の細胞。
- 5
- 10
- 15
- 20
15. 請求項10に記載の遺伝子導入用ベクターの有効量を、薬学的担体と共に含有する遺伝子治療用組成物。
 16. 遺伝子導入用ベクターが請求項11に記載のものである請求項15に記載の遺伝子治療用組成物。
 17. 請求項12に記載の細胞の有効量を、薬学的担体と共に含有する遺伝子治療用組成物。
 18. 細胞が請求項13に記載のものである請求項17に記載の遺伝子治療用組成物。
 19. 細胞が請求項14に記載のものである請求項17に記載の遺伝子治療用組成物。
 20. 癌患者に投与して癌細胞の増殖抑制又は癌転移を

抑制するものである請求項 15 ～ 19 のいずれかに記載の遺伝子治療用組成物。

21. 癌細胞が、膵臓癌細胞である請求項 20 に記載の遺伝子治療用組成物。

5 22. 請求項 10 に記載の遺伝子導入用ベクターの有効量を癌患者に投与して、癌細胞の増殖抑制又は癌転移を抑制する方法。

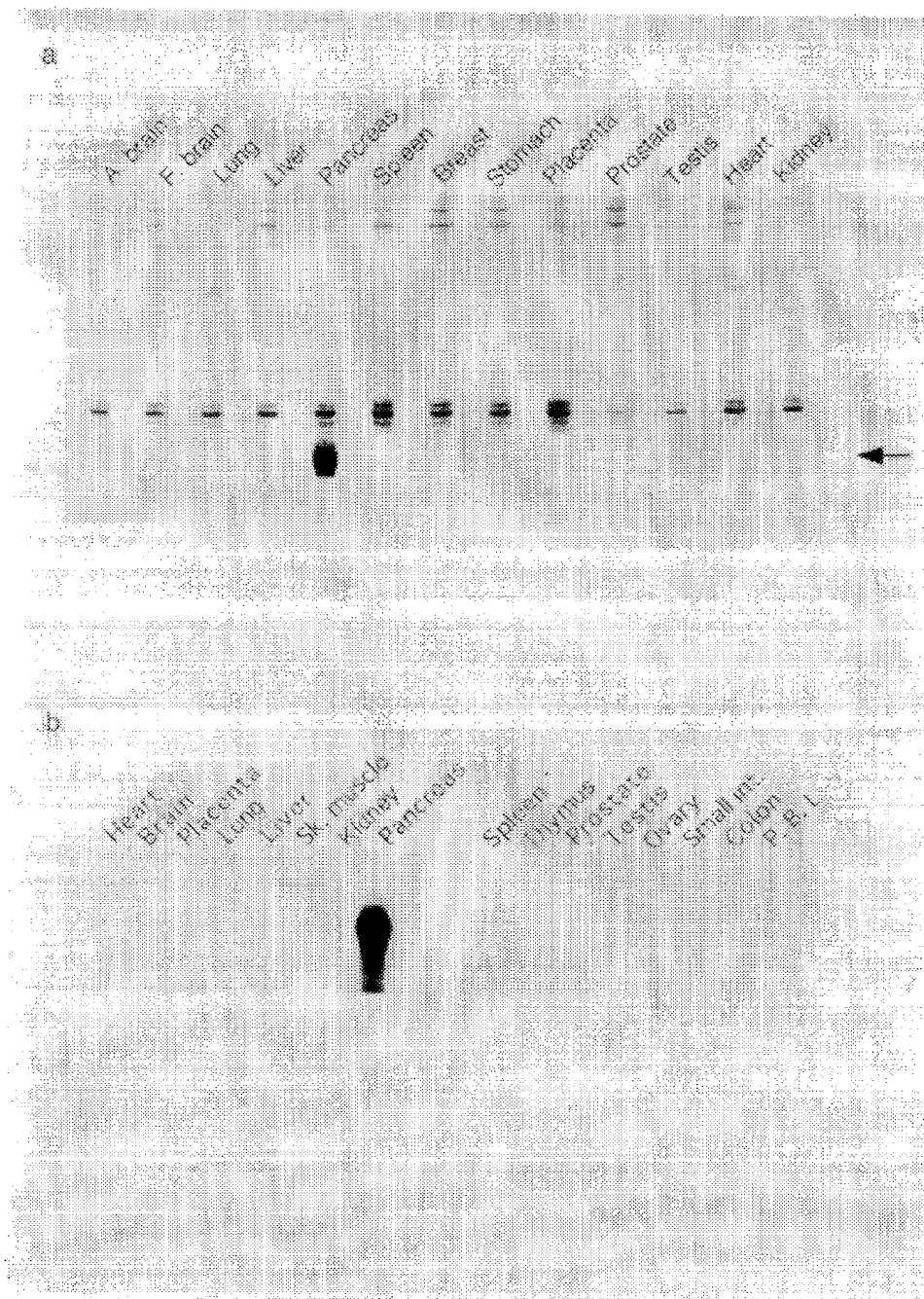
23. 請求項 12 に記載の細胞の有効量を癌患者に投与して、癌細胞の増殖抑制又は癌転移を抑制する方法。

10 24. 請求項 10 に記載の遺伝子導入用ベクターの、遺伝子治療用組成物の製造のための使用。

25. 請求項 12 に記載の細胞の、遺伝子治療用組成物の製造のための使用。

1/11

F i g. 1



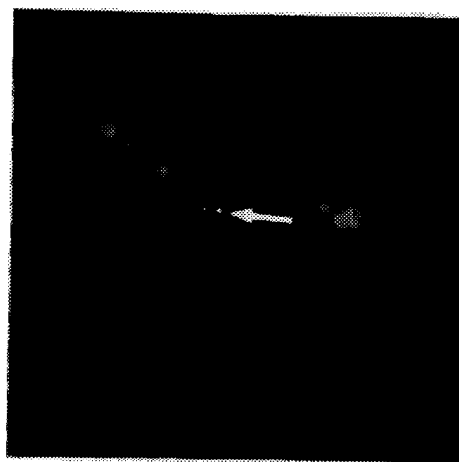
2/11

F i g. 2

pancypin	1	MDHIFNSSL	IFFPSCAS	CSAKNFA	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	49	
PAI-2	1	DE	AVI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	32
SCCA-1	1	DE	AVI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	31
SI	1	DE	AVI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	32
Maspin	2	DE	AVI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	32
pancypin	80	LSHLL	LA	QANNG	XX	DE	SVSL	H	YTH	SE	66	
PAI-2	80	NSIDGMA	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	62		
SCCA-1	80	ISIDGMA	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	62		
SI	80	ISIDGMA	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	62		
Maspin	80	ISIDGMA	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	62		
pancypin	88	DE	SVSL	H	YTH	SE	114			
PAI-2	88	QYQVSSQ	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	132		
SCCA-1	88	QYQVSSQ	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	130		
SI	88	QYQVSSQ	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	98		
Maspin	88	QYQVSSQ	NI	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	98		
pancypin	118	MDHIFNSSL	IFFPSCAS	CSAKNFA	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	163	
PAI-2	118	DE	SVSL	H	YTH	SE	132			
SCCA-1	118	DE	SVSL	H	YTH	SE	130			
SI	118	DE	SVSL	H	YTH	SE	146			
Maspin	118	DE	SVSL	H	YTH	SE	146			
pancypin	164	MDHIFNSSL	IFFPSCAS	CSAKNFA	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	323	
PAI-2	164	DE	SVSL	H	YTH	SE	322			
SCCA-1	164	DE	SVSL	H	YTH	SE	322			
SI	164	DE	SVSL	H	YTH	SE	322			
Maspin	164	DE	SVSL	H	YTH	SE	322			
pancypin	214	MDHIFNSSL	IFFPSCAS	CSAKNFA	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	259	
PAI-2	214	DE	SVSL	H	YTH	SE	279			
SCCA-1	214	DE	SVSL	H	YTH	SE	279			
SI	214	DE	SVSL	H	YTH	SE	243			
Maspin	214	DE	SVSL	H	YTH	SE	243			
pancypin	260	MDHIFNSSL	IFFPSCAS	CSAKNFA	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	327	
PAI-2	260	DE	SVSL	H	YTH	SE	327			
SCCA-1	260	DE	SVSL	H	YTH	SE	327			
SI	260	DE	SVSL	H	YTH	SE	327			
Maspin	260	DE	SVSL	H	YTH	SE	327			
pancypin	308	MDHIFNSSL	IFFPSCAS	CSAKNFA	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	376	
PAI-2	308	DE	SVSL	H	YTH	SE	376			
SCCA-1	308	DE	SVSL	H	YTH	SE	376			
SI	308	DE	SVSL	H	YTH	SE	346			
Maspin	308	DE	SVSL	H	YTH	SE	346			
pancypin	357	MDHIFNSSL	IFFPSCAS	CSAKNFA	PA	DE	SVSL	H	YTH	SE	402	
PAI-2	357	DE	SVSL	H	YTH	SE	418			
SCCA-1	357	DE	SVSL	H	YTH	SE	418			
SI	357	DE	SVSL	H	YTH	SE	418			
Maspin	357	DE	SVSL	H	YTH	SE	418			
pancypin	404	SL									404	

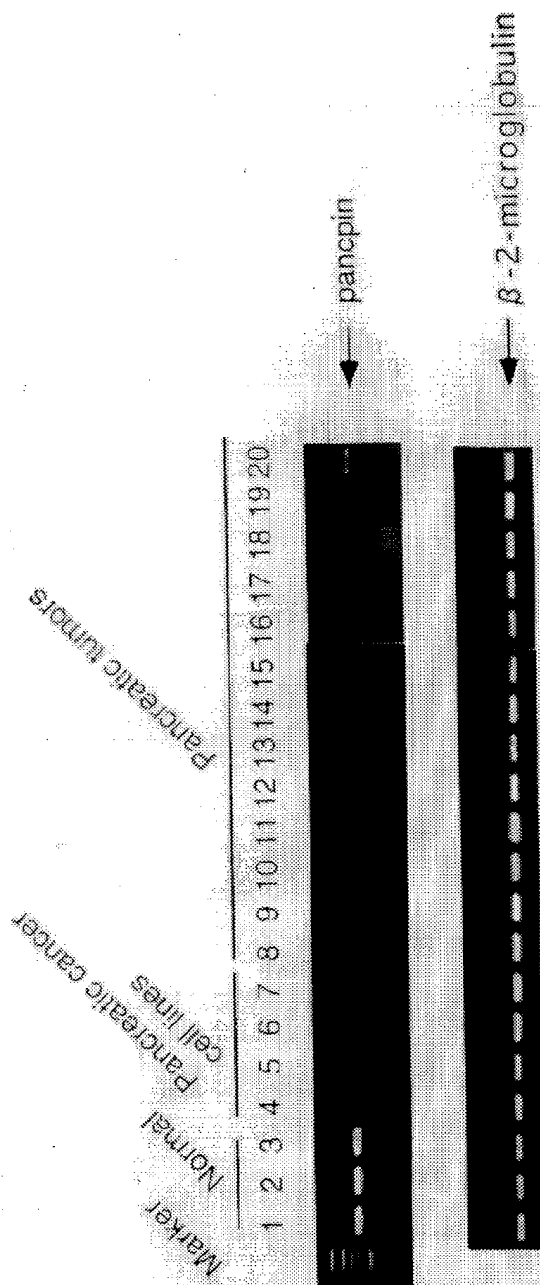
3/11

F i g. 3



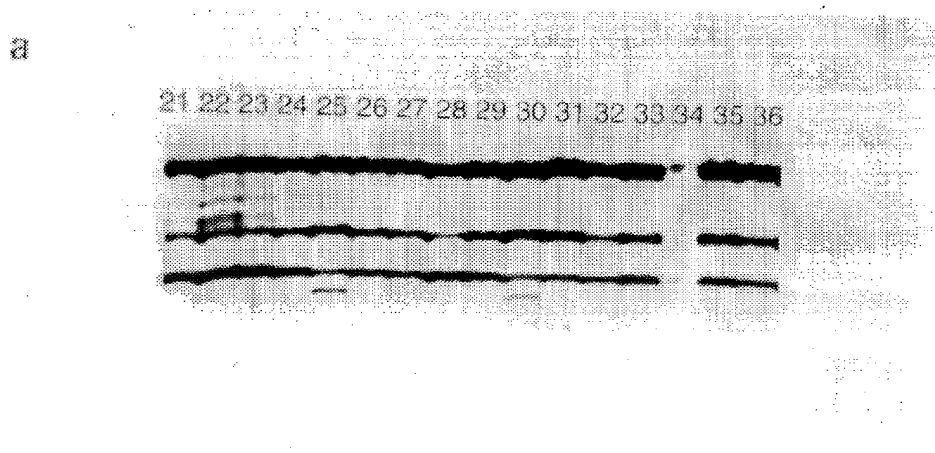
4/11

F i g. 4



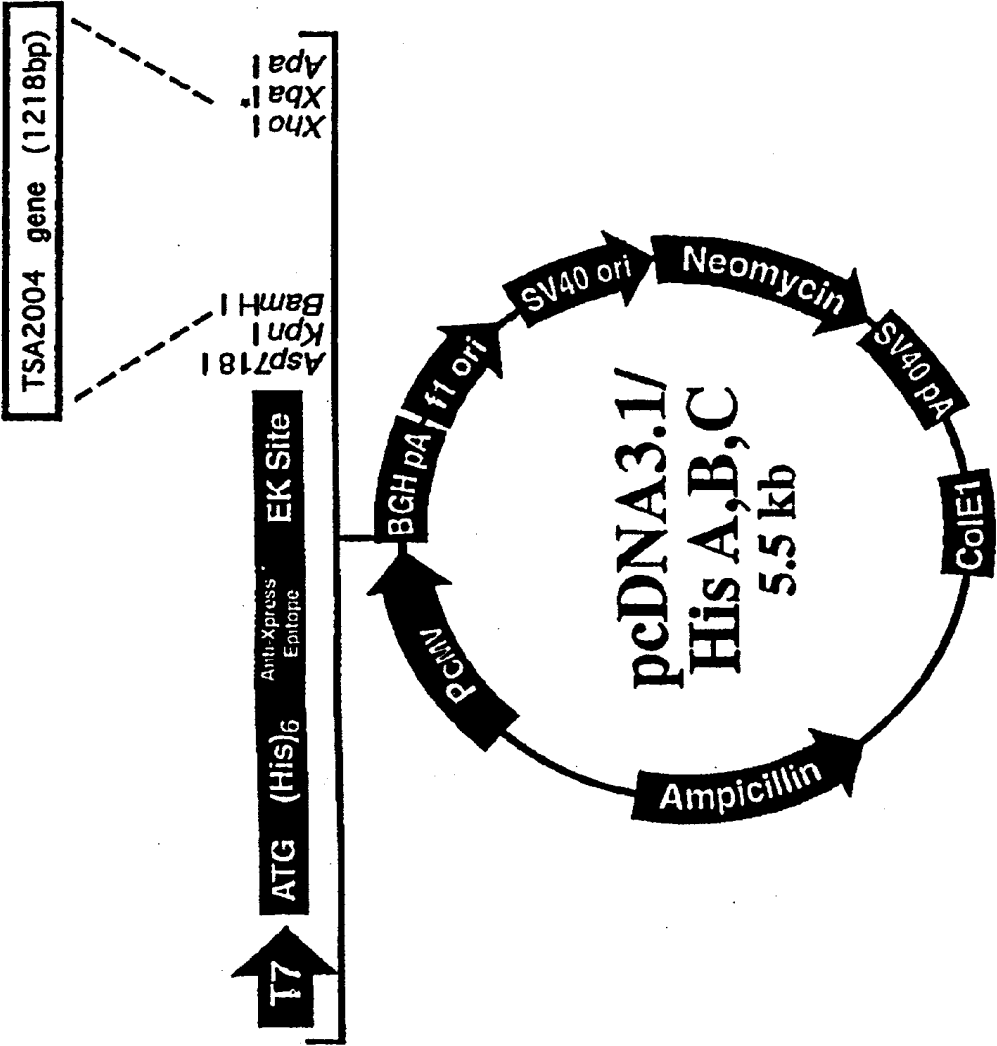
5/11

F i g . 5



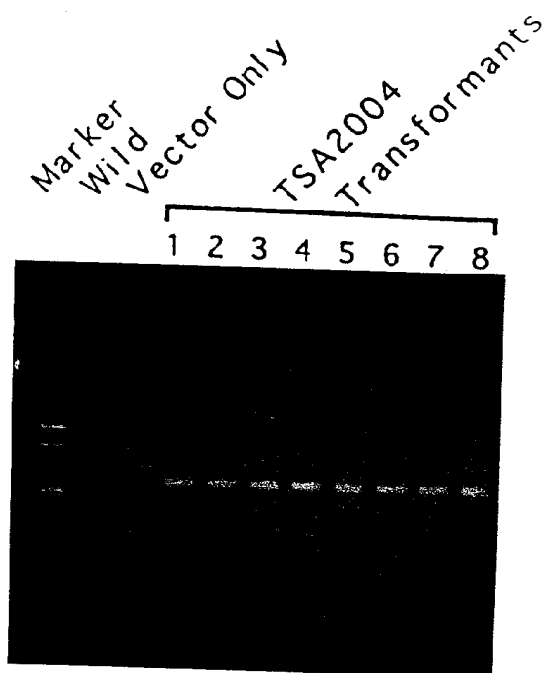
6/11

F i g . 6

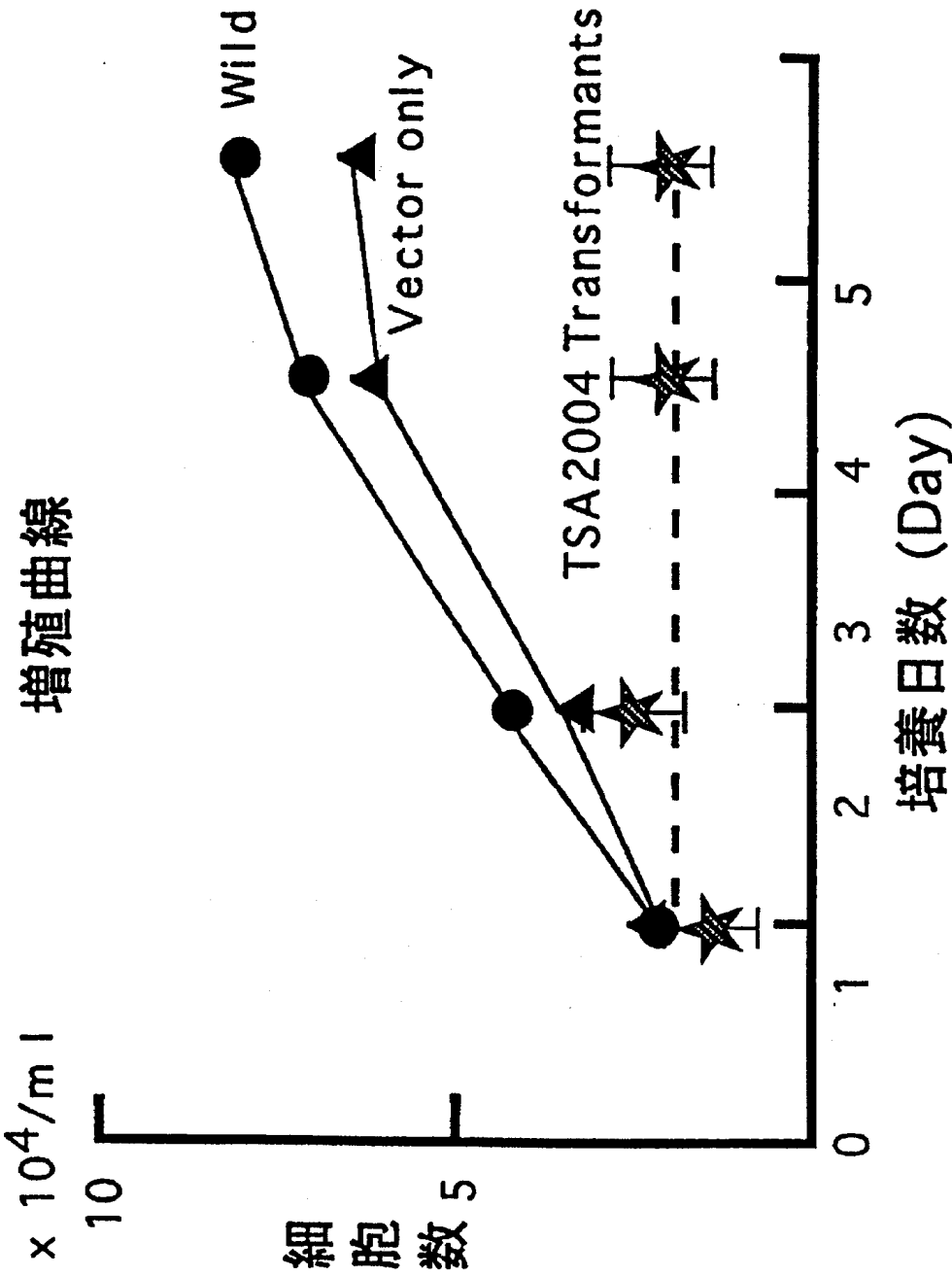


7/11

F i g . 7



F i g. 8



9/11

F i g. 9



10/11

F i g. 1 0

レ レ
| |
ン ン
1 2



11/11

F i g . 1 1



1/12

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Ostuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> pancpin gene and composition for gene therapy

<130> P98-37

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 405

<212> PRT

<213> human pancreas cDNA library

<400> 1

Met Asp Thr Ile Phe Leu Trp Ser Leu Leu Leu Phe Phe Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Ala Ser Arg Cys Ser Ala Gln Lys Asn Thr Glu Phe Ala Val Asp
 20 25 30

Leu Tyr Gln Glu Val Ser Leu Ser His Lys Asp Asn Ile Ile Phe Ser
 35 40 45

Pro Leu Gly Ile Thr Leu Val Leu Glu Met Val Gln Leu Gly Ala Lys
 50 55 60

Gly Lys Ala Gln Gln Gln Ile Arg Gln Thr Leu Lys Gln Gln Glu Thr
 65 70 75 80

Ser Ala Gly Glu Glu Phe Phe Val Leu Lys Ser Phe Phe Ser Ala Ile
 85 90 95

Ser Glu Lys Lys Gln Glu Phe Thr Phe Asn Leu Ala Asn Ala Leu Tyr
 100 105 110

Leu Gln Glu Gly Phe Thr Val Lys Glu Gln Tyr Leu His Gly Asn Lys

2/12

115	120	125
Glu Phe Phe Gln Ser Ala Ile Lys Leu Val Asp Phe Gln Asp Ala Lys		
130	135	140
Ala Cys Ala Glu Met Ile Ser Thr Trp Val Glu Arg Lys Thr Asp Gly		
145	150	155
Lys Ile Lys Asp Met Phe Ser Gly Glu Glu Phe Gly Pro Leu Thr Arg		
165	170	175
Leu Val Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asp Trp Lys Gln Lys		
180	185	190
Phe Arg Lys Glu Asp Thr Gln Leu Ile Asn Phe Thr Lys Lys Asn Gly		
195	200	205
Ser Thr Val Lys Ile Pro Met Met Lys Ala Leu Leu Arg Thr Lys Tyr		
210	215	220
Gly Tyr Phe Ser Glu Ser Ser Leu Asn Tyr Gln Val Leu Glu Leu Ser		
225	230	235
Tyr Lys Gly Asp Glu Phe Ser Leu Ile Ile Ile Leu Pro Ala Glu Gly		
245	250	255
Met Asp Ile Glu Glu Val Glu Lys Leu Ile Thr Ala Gln Gln Ile Leu		
260	265	270
Lys Trp Leu Ser Glu Met Gln Glu Glu Glu Val Glu Ile Ser Leu Pro		
275	280	285
Arg Phe Lys Val Glu Gln Lys Val Asp Phe Lys Asp Val Leu Tyr Ser		
290	295	300
Leu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ser Gly Gly Cys Asp Leu Ser Gly Ile		
305	310	315
Thr Asp Ser Ser Glu Val Tyr Val Ser Arg Val Thr Gln Lys Val Phe		
325	330	335
Phe Glu Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Ala Ala Thr Ser Thr Gly Ile		
340	345	350

3/12

His Ile Pro Val Ile Met Ser Leu Ala Gln Ser Gln Phe Ile Ala Asn
 355 360 365
 His Pro Phe Leu Phe Ile Met Lys His Asn Pro Thr Glu Ser Ile Leu
 370 375 380
 Phe Met Gly Arg Val Thr Asn Pro Asp Thr Gln Glu Ile Lys Gly Arg
 385 390 395 400
 Asp Leu Asp Ser Leu
 405

<210> 2

<211> 1465

<212> DNA

<213> human pancreas cDNA library

<220>

<221> CDS

<222> (58).. (1272)

<400> 2

```

gtttcagcgg ccgctgaatt ctaggaataa tcagaagtca gtttgggaga agtcaaa      57
atg gac aca atc ttc ttg tgg agt ctt cta ttg ctg ttt ttt gga agt      105
Met Asp Thr Ile Phe Leu Trp Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe Gly Ser
  1             5             10             15
caa gcc tca aga tgc tca gct caa aaa aat acc gaa ttt gca gtg gat      153
Gln Ala Ser Arg Cys Ser Ala Gln Lys Asn Thr Glu Phe Ala Val Asp
      20             25             30
ctt tat caa gag gtt tcc tta tct cat aag gac aac att ata ttt tca      201
Leu Tyr Gln Glu Val Ser Leu Ser His Lys Asp Asn Ile Ile Phe Ser
      35             40             45
ccc ctt gga ata act ttg gtt ctt gag atg gta caa ctg gga gcc aaa      249
Pro Leu Gly Ile Thr Leu Val Leu Glu Met Val Gln Leu Gly Ala Lys

```

4/12

50	55	60	
gga aaa gca cag cag cag ata aga caa act tta aaa caa cag gaa acc			297
Gly Lys Ala Gln Gln Gln Ile Arg Gln Thr Leu Lys Gln Gln Glu Thr			
65	70	75	80
tca gct ggg gaa gaa ttt ttt gta ctg aag tca ttt ttc tct gcc atc			345
Ser Ala Gly Glu Glu Phe Phe Val Leu Lys Ser Phe Phe Ser Ala Ile			
85	90	95	
tca gag aaa aaa caa gaa ttt aca ttt aat ctt gcc aat gcc ctc tac			393
Ser Glu Lys Lys Gln Glu Phe Thr Phe Asn Leu Ala Asn Ala Leu Tyr			
100	105	110	
ctt caa gaa gga ttc act gtg aaa gaa cag tat ctc cat ggc aac aag			441
Leu Gln Glu Gly Phe Thr Val Lys Glu Gln Tyr Leu His Gly Asn Lys			
115	120	125	
gaa ttt ttt cag agt gct ata aaa ctg gtg gat ttt caa gat gca aag			489
Glu Phe Phe Gln Ser Ala Ile Lys Leu Val Asp Phe Gln Asp Ala Lys			
130	135	140	
gct tgt gca gag atg ata agt acc tgg gta gaa aga aaa aca gat gga			537
Ala Cys Ala Glu Met Ile Ser Thr Trp Val Glu Arg Lys Thr Asp Gly			
145	150	155	160
aaa att aaa gac atg ttt tca ggg gaa gaa ttt ggc cct ctg act cgg			585
Lys Ile Lys Asp Met Phe Ser Gly Glu Glu Phe Gly Pro Leu Thr Arg			
165	170	175	
ctt gtc ctg gtg aat gct att tat ttc aaa gga gat tgg aaa cag aaa			633
Leu Val Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asp Trp Lys Gln Lys			
180	185	190	
ttc aga aaa gag gac aca cag ctg ata aat ttt act aag aaa aat ggt			681
Phe Arg Lys Glu Asp Thr Gln Leu Ile Asn Phe Thr Lys Lys Asn Gly			
195	200	205	
tca act gtc aaa att cca atg atg aag gct ctt ctg aga aca aaa tat			729

5/12

Ser Thr Val Lys Ile Pro Met Met Lys Ala Leu Leu Arg Thr Lys Tyr
 210 215 220
 ggt tat ttt tct gaa tct tcc ctg aac tac caa gtt tta gaa ttg tct 777
 Gly Tyr Phe Ser Glu Ser Ser Leu Asn Tyr Gln Val Leu Glu Leu Ser
 225 230 235 240
 tac aaa ggt gat gaa ttt agc tta att atc ata ctt cct gca gaa ggt 825
 Tyr Lys Gly Asp Glu Phe Ser Leu Ile Ile Ile Leu Pro Ala Glu Gly
 245 250 255
 atg gat ata gaa gaa gtg gaa aaa cta att act gct caa caa atc cta 873
 Met Asp Ile Glu Glu Val Glu Lys Leu Ile Thr Ala Gln Gln Ile Leu
 260 265 270
 aaa tgg ctc tct gag atg caa gaa gag gaa gta gaa ata agc ctc cct 921
 Lys Trp Leu Ser Glu Met Gln Glu Glu Glu Val Glu Ile Ser Leu Pro
 275 280 285
 aga ttt aaa gta gaa caa aaa gta gac ttc aaa gac gtt ttg tat tct 969
 Arg Phe Lys Val Glu Gln Lys Val Asp Phe Lys Asp Val Leu Tyr Ser
 290 295 300
 ttg aac ata acc gag ata ttt agt ggt ggc tgc gac ctt tct gga ata 1017
 Leu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ser Gly Gly Cys Asp Leu Ser Gly Ile
 305 310 315 320
 aca gat tca tct gaa gtg tat gtt tcc cga gtg acg caa aaa gtt ttc 1065
 Thr Asp Ser Ser Glu Val Tyr Val Ser Arg Val Thr Gln Lys Val Phe
 325 330 335
 ttt gag ata aat gaa gat ggt agt gaa gct gca aca tca act ggc ata 1113
 Phe Glu Ile Asn Glu Asp Gly Ser Glu Ala Ala Thr Ser Thr Gly Ile
 340 345 350
 cac atc cct gig atc atg agt ctg gct caa agc caa ttt ata gca aat 1161
 His Ile Pro Val Ile Met Ser Leu Ala Gln Ser Gln Phe Ile Ala Asn
 355 360 365

6/12

cat cca ttt ctg ttt att atg aag cat aat cca aca gaa tca att cig 1209
 His Pro Phe Leu Phe Ile Met Lys His Asn Pro Thr Glu Ser Ile Leu
 370 375 380
 ttt atg gga aga gtg aca aat cct gac acc cag gag ata aaa gga aga 1257
 Phe Met Gly Arg Val Thr Asn Pro Asp Thr Gln Glu Ile Lys Gly Arg
 385 390 395 400
 gat tta gat tca ctg tga atgaaaagca cagcctcaga ataaaagatg 1305
 Asp Leu Asp Ser Leu *
 405

atttctcaaa aatagctgat tggcaaaata tcgtcatctt gacaatatit gctctatatc 1365
 ttatgtcttt tcgtgttttaa actgtgccctg tagtaataga taltgtctt gatgaataag 1425
 taaaattagg tatgcatitg ttcaaaaaa aaaaaaaac 1465

<210> 3

<211> 1215

<212> DNA

<213> human pancreas cDNA library

<400> 3

atggacacaa tcttcttgtg gagtcttcta ttgctgtttt ttggaagtca agcctcaaga 60
 tgctcagctc aaaaaaatac cgaatttgca gtggatcttt atcaagaggt ttccttatct 120
 cataaggaca acattatatt ttacacctt ggaataacit tggttcttga gatggtacaa 180
 ctggggagcca aaggaaaagc acagcagcag ataagacaaa cttaaaaca acaggaaacc 240
 tcagctgggg aagaattttt tgtactgaag tcatttttct ctgccatctc agagaaaaaa 300
 caagaattta catttaatct tgccaatgcc ctctaccttc aagaaggatt cactgtgaaa 360
 gaacagtatc tccatggcaa caaggaattt tticagagtg ctataaaact ggtggatttt 420
 caagatgcaa aggccttgtc agagatgata agtacctggg tagaaagaaa aacagatgga 480
 aaaattaaag acatgttttc aggggaagaa ttigggccctc tgactcggtc tglcctgggtg 540
 aatgctatit atttcaaagg agatiggaaa cagaaattca gaaaagagga cacacagctg 600
 ataaatttta ctaagaaaaa tggttcaact gtcaaaattc caatgatgaa ggtcttctg 660

7/12

```

agaacaaaat atgggtatit tctgaatct tccctgaact accaagtitt agaattgict 720
tacaaaggig atgaatttag cttaattatc atacttccctg cagaagggtat ggatatagaa 780
gaagtggaag aactaattac tgcacaaca atcctaaaat ggctctctga gatgcaagaa 840
gaggaagtag aaataagcct ccctagattt aaagtagaac aaaaagtaga cttcaaagac 900
gttttgtatt ctitgaacat aaccgagata ttttagtggtg gctgcgacct ttctggaata 960
acagattcat ctgaagtgta tgtttcccgat gtgacgcaaa aagttttctt tgagataaat 1020
gaagatggta gtgaagctgc aacatcaact ggcatacaca tccctgtgat catgagtctg 1080
gctcaaagcc aatttatagc aaatcatcca ttcttgitta ttaagaagca taatccaaca 1140
gaatcaattc tgittatggg aagagtgaca aatccctgaca cccaggagat aaaaggaaga 1200
gatttagatt cactg
1215

```

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 4

acttctgca gaaggtatgg

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 5

tcattcttta ttctgaggc

19

8/12

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 6

aagctacaac aggtagaaag

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 7

aatgcgcca tatcttatcc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 8

atagcaaagc tgaaaagctg

20

<210> 9

<211> 20

9/12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 9

cagccattct ttactttagg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 10

ccactgaatc actatigcac

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 11

tacttggcaa ttctcaagac

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10/12

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 12

tagcttgaga attgccaag

19

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 13

gggaggccta ttctacttc

20

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 14

cggatccatg gacacaatct tcttgggag

30

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

11/12

<400> 15

cctcgagtca cagtgaatct aaatctcttc c

31

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 16

ttcttggagt ggtacaactg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 17

tctgtttcca atctcctttg

20

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 18

gcgcgaattc aaagaacagt atctccatgg c

31

12/12

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic primer having a partial sequence of TSA2004 gene

<400> 19

ccctcgagtca cagtgaatct aatctcttc c

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/435, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/20, C12N15/63, C12N5/10, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/435, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/20, C12N15/63, C12N5/10, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, Swissprot/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO, 96/34957, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 7 November, 1996 (07. 11. 96) & EP, 826048, A1 & US, 5804376, A	<u>1-9</u> 10-21, 24
P, X	WO, 98/07735, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 26 February, 1998 (26. 02. 98) & AU, 9673579, A	1-21, 24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 December, 1998 (15. 12. 98)Date of mailing of the international search report
22 December, 1998 (22. 12. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/435, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/20, C12N15/63, C12N5/10, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/435, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/20, C12N15/63, C12N5/10, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
Swissprot/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO, 96/34957, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 7.11月.1996 (07.11.96) & EP, 826048, A1 & US, 5804376, A	<u>1-9</u> 10-21, 24
P, X	WO, 98/07735, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 26.2月.1998 (26.02.98) & AU, 9673579, A	1-21, 24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 12. 98

国際調査報告の発送日

22.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4 B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449